



TITLE:

# 魚肉軟化現象の解明 - トランスジェニックマダイを用いた解析 -

AUTHOR(S):

豊原, 治彦

---

CITATION:

豊原, 治彦. 魚肉軟化現象の解明 - トランスジェニックマダイを用いた解析 -. 2006

ISSUE DATE:

2006-06

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/85059>

RIGHT:

# 研 究 成 果 報 告 書

---

魚肉軟化現象の解明  
-トランスジェニックマダイを用いた解析-

---

15380142

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (B))研究成果報告書

京 都 大 学 図 書



1060665998 平成18年6月

附 属 図 書 館

研究代表者 豊原治彦

京都大学 農学研究科 助教授

# 研 究 成 果 報 告 書

## 魚肉軟化現象の解明 -トランスジェニックマダイを用いた解析-

15380142

### 平成15年度～平成17年度科学研究費補助金 (基盤研究 (B) )研究成果報告書

	平成15年度	平成16年度	平成17年度	合計
研究費	6,200,000	4,300,000	4,700,000	15,200,000
経費	0	0	0	0
合計	6,200,000	4,300,000	4,700,000	15,200,000

#### 研究発表

##### (1)学会発表

K. Toyahara: Molecular cloning and characterization of a tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) from red seabream cultured cells. Fisheries Science, in press 2005

M. Toyahara: Establishment of a transgenic medaka line expressing Japanese flounder tissue inhibitor of metalloproteinase for the suppression of post-mortem meat tenderization. Marine Biotechnology, (6) 2004

S. Kubota: Occurrence of two distinct types of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in teleost fish. Biochim. Biophys. Acta, (1629) 2003

M. Kubota: Stabilization of skeletal muscle connective tissue by overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 at chilled temperature. Fisheries Science (69) 2003

平成18年6月

##### (2)研究発表

研究代表者 豊原治彦

豊原治彦: プロテアーゼ抑制剤による魚肉の軟化抑制効果の解析

京都大学 農学研究科 助教授

京都大学 農学研究科 助教授 豊原治彦: マダイの組織型TIMP-2の発現とTIMP-2の過剰発現による魚肉の軟化抑制効果の解析

## はしがき

冷蔵中における魚肉の軟化現象は品質低下につながることから、その原因解明と軟化防止策が待たれている。私たちのこれまでの研究から、魚肉の軟化は筋肉細胞を接着している結合組織の脆弱化によること、及び脆弱化の原因はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) による結合組織コラーゲンの分解にあることが明らかにになっていることが明らかにになっている。本研究においては、重要な養殖魚であるマダイからMMPの内因性の阻害タンパク質であるTIMPの遺伝子をクローニングし、TIMP遺伝子を強制発現させたトランスジェニックマダイを作成し、その肉質に与える影響を検討・解析することで、魚肉軟化現象へのTIMPの関与を明らかにするとともに水産育種への応用を図ることを目的とする。

## 研究組織

研究代表者 : 豊原 治彦 (京都大学 農学研究科 助教授)  
研究分担者 : 木下 政人 (京都大学 農学研究科 助手)  
研究分担者 : 家戸 敬太郎 (近畿大学 水産研究所 講師)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	6,200,000	0	6,200,000
平成16年度	4,300,000	0	4,300,000
平成17年度	4,700,000	0	4,700,000
総計	15,200,000	0	15,200,000

## 研究発表

### (1) 学会誌等

K. Touhata Molecular cloning and characterization of a tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-2, from red seabream cultured cells. Fisheries Science in press 2006

H. Toyohara Establishment of a transgenic medaka line expressing Japanese flounder tissue inhibitor of metalloproteinase for the suppression of post-mortem meat tenderization. Marine Biotechnol. (6) 2004

S. Kubota Occurrence of two distinct types of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in teleost fish. Biochim. Biophys. Acta. (1629) 2003

M. Kubota Solubilization of Type I collagen from fish muscle connective tissue by matrix metalloproteinase-9 at chilled temperature. Fisheries Science (69) 2003

### (2) 口頭発表等

豊原治彦 プロテアーゼインヒビター遺伝子の導入による養殖魚の肉質改良の試み マリンバイオテクノロジー学会 2006. 5. 28

家戸敬太郎 マダイ胚cDNAデータベースの構築とcDNAマイクロアレイの作成 日本分子生物学会年会 2005. 12. 8



家戸敬太郎 海産魚におけるトランスジェニック研究 日本水産学会近畿支部前期例会シンポジウム 2005. 7. 2

H. Toyohara. Improvement of fish meat quality by transgenic technology, International Marine Biotechnology Conference 2005.6.15

K. Kato et al. Development of transgenic technology for red sea bream, *Pagrus major* International Marine Biotechnology Conference 2005 2005.6.11

J. Mutsuro et al. Annotations and expression profiles of 9,408 clones from embryonic cDNA libraries of red sea bream, *Pagrus major* International Marine Biotechnology Conference 2005 2005.6.11

家戸敬太郎 マダイの遺伝子導入用発現ベクターの構築とマイクロインジェクションによる導入 日本水産学会大会 2005. 4. 2

無津呂淳一 マダイ胚cDNAライブラリー構築と解析 日本水産学会大会 2005. 4. 1

長谷川徹 マダイの初期発生過程 日本水産学会大会 2005. 4. 1

東畑顕 マダイMMP-9のcDNAクローニング 日本水産学会 2005. 4

豊原治彦 遺伝子組換えによる魚類の肉質改善 日本水産学会増殖懇話会 2005. 1. 30

H. Toyohara. Making a transgenic fish with high meat quality. The 6th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2004.12.1

家戸敬太郎 海産魚養殖におけるバイオテクノロジーの活用 “第20回ライフサイエンスセミナー20周年記念セミナー「海の恵み」” 2004. 10. 29

豊原治彦 トランスジェニックテクノロジーを用いた魚類の肉質改善の試み 日本水産学会 2004. 4. 2

家戸敬太郎 海産魚のトランスジェニック技術と肉質改善への利用の試み 食品酵素化学研究会 2004. 1. 25

高木雅哉 新規なTIMP-2機能解析ならびにトランスジェニック魚への応用研究 分子生物学会 2003. 12. 20

家戸敬太郎 海産魚の遺伝子導入用発現ベクターの開発 日本水産学会近畿支部後期例会 2003. 11. 28

家戸敬太郎 海産魚の遺伝子導入用発現ベクターの開発 日本水産増殖学会 2003. 10. 12

H. Toyohara. Novel TIMP-2 – Functional analysis and application to transgenic fish, International Symposium on Medical and Biological Perspectives in Proteases and their Inhibitors 2003.10.30

家戸敬太郎ら 海水魚の遺伝子導入用発現ベクターの開発 日本生物工学会  
大会 2003.9.16

東畑顕 マダイTIMP-2のcDNAクローニング 日本水産学会 2003.4

(3) 出版物等

豊原治彦 バイオサイエンスの新戦略—魚類生産とバイオテクノロジー 丸善 2004

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

$\alpha$ -アクチンプロモーター遺伝子, 発現ベクター及び遺伝子導入魚類 家  
戸敬太郎・豊原治彦 独立行政法人科学技術振興機構・学校法人近畿大学  
特許出願、2005年3月22日 RJ008P18 登録申請準備中

Affiliation

<sup>1</sup> Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,  
Kyoto, 606-8502, Japan

<sup>2</sup> Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Marine Science and  
Technology, Tokyo, 108-8477, Japan

<sup>3</sup> Department of Agriculture, Kochi University, Nankoku, 783-8592, Japan

\*Corresponding author: Tel: +81-75-753-6446, Fax: +81-75-753-6446, e-mail:  
myohara@kais.kyoto-u.ac.jp

# **Establishment of a Transgenic Medaka Line Expressing Japanese Flounder Tissue Inhibitor of Metalloproteinase as a model for the Suppression of Post-Mortem Meat Tenderization**

Running title: Transgenic Medaka Expressing Metalloproteinase Inhibitor

Haruhiko Toyohara<sup>1, \*</sup>, Masaya Takagi<sup>1</sup>, Masatomi Hosoi<sup>1</sup>, Masato Kinoshita<sup>1</sup>, Ikuro Hirono<sup>2</sup>, Takashi Aoki<sup>2</sup>, and Satoshi Kubota<sup>3</sup>

## **Affiliation**

<sup>1</sup> Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, 606-8502, Japan

<sup>2</sup> Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, 108-8477, Japan

<sup>3</sup> Department of Agriculture, Kochi University, Nankoku, 783-8502, Japan

\*Corresponding author: Tel; +81-75-753-6446, Fax; +81-75-753-6446, e-mail; toyohara@kais.kyoto-u.ac.jp

**Key words:** collagen, Japanese flounder, matrix metalloproteinase, medaka, muscle, transgenic fish, tissue inhibitor of metalloproteinase

## Abstract.

Fish meat is rapidly tenderized in accordance with the storage time after death. Tenderization is supposed to be caused by solubilization of collagen in the connective tissue induced by matrix metalloproteinases (MMPs). In the living state, the activity of MMPs is regulated by endogenous tissue inhibitors of MMP (TIMPs). Thus, we made an attempt to produce a transgenic fish line overexpressing TIMP to suppress post-mortem muscle tenderization by using medaka, a useful laboratory model fish. As a result, we have successfully established a transgenic medaka line harbored Japanese flounder TIMP-2 (jfTIMP-2) gene. Expression of the transgene was confirmed both at the transcriptional and translational levels. No apparently histological difference in muscle tissues between the transgenic fish (F<sub>2</sub>) and non-transgenic fish was observed immediately after death. After storage for 24 h at chilled temperature, however, the muscle fibers remained intact in the transgenic fish, while those in the non-transgenic fish were detached each other possibly due to the loss of physical strength of the connective tissues. This indicates a possibility that overexpressed jfTIMP-2 protein inhibited the activity of medaka endogenous MMP *in vivo* and suppressed the proteolytic breakdown of collagen that caused the post-mortem muscle tenderization.

**Key words:** collagen, Japanese flounder, matrix metalloproteinase, medaka, muscle, transgenic fish, tissue inhibitor of metalloproteinase

The superfamily members of matrix metalloproteinases play an important role in the metabolism of the extracellular matrix proteins including various molecular species of collagens that are the main components of the connective tissues (Miyasawa et al., 1998; Nagase et al., 1999). Among MMPs, MMP-9 is a possible candidate implicating in post-mortem meat tenderization of fish judged from its substrate specificity (Kubota, M et al., 2003). The inhibition of MMP activities occurs through interaction with an endogenous inhibitor named tissue inhibitor of MMP (TIMP) which consists of distinct four families of TIMPs 1-4 (Dow et al., 2000). Among these TIMPs, TIMP-2 is possibly involved in the regulation of MMP-9 in fish muscle (Kubota, M et al., 2003) and we could successfully clone TIMP-2 (jfTIMP-2) gene from Japanese flounder (Kubota, S et al., 2003). Thus, in the present study, we made an attempt to produce a transgenic medaka line expressing jfTIMP-2 protein to suppress post-mortem meat tenderization.



## MATERIAL AND METHODS

### INTRODUCTION

#### Materials

Gene transfer into fish embryo by microinjection has been preformed in various fish species to produce a transgenic fish line with a superior property (Hackett et al., 1993). Among various fish species, medaka has been exclusively utilized as a model fish to study the function and application of a useful gene as well as zebrafish (Kinoshita and Tanaka, 2003).

Raw fish dishes such as sushi and sashimi are now being accepted worldwide especially in the Western countries. Texture is one of the important factors determining the quality of fish meat as well as taste and color. Generally, tough texture is preferred in raw fish dishes particularly in Japan, but fish meat is rapidly tenderized in accordance with the storage time after death, even if fish is stored at chilled temperature (Toyohara and Shimizu., 1988; Ando et al., 1991).

Recent studies suggested that toughness of fish meat is mainly dependent on the physical strength of the connective tissue binding muscle fibers (Sato et al., 1986; Hatae et al., 1986). Solubilization of collagen from the connective tissues occurs during chilled storage, thereby inducing the loss of physical strength of connective tissue (Ando et al., 1991). Solubilization of collagen is supposed to be due to the proteolytic breakdown by matrix metalloproteinases (MMPs), because the injection of 1, 10-phenanthroline, a specific inhibitor for MMPs, suppressed the meat tenderization (Kubota et al., 2001).

The superfamily members of matrix metalloproteinases play an important role in the metabolism of the extracellular matrix proteins including various molecular species of collagens that are the main components of the connective tissues (Massova et al., 1998; Nagase et al., 1999). Among MMPs, MMP-9 is a possible candidate implicating in post-mortem meat tenderization of fish judged from its substrate specificity (Kubota, M et al., 2003). The inhibition of MMP activities occurs through interaction with an intrinsic inhibitor named tissue inhibitor of MMP (TIMP) which consists of distinct four families of TIMPs 1-4 (Brew et al., 2000). Among these TIMPs, TIMP-2 is possibly involved in the regulation of MMP-9 in fish muscle (Kubota, M et al., 2003) and we could successfully clone TIMP-2 (jfTIMP-2) gene from Japanese flounder (Kubota, S et al., 2003). Thus, in the present study, we made an attempt to produce a transgenic medaka line expressing jfTIMP-2 protein to suppress post-mortem meat tenderization.

## MATERIAL AND METHODS

### Materials

The medaka strain used in the present study was Hd-rR. Medaka were kept at 26°C with a circulating tank system as described (Kinoshita and Tanaka, 2003). Reagents used in the present study not specified were of the highest quality obtained from Nacalai Tesque.

### Construction of an Expression Vector for jfTIMP-2 and Microinjection

Full length of jfTIMP-2 cDNA (Kubota, S et al., 2003) was subcloned into an expression vector regulated by the promoter region of medaka skeletal muscle actin gene (OlMA1) kindly gifted from Dr. Kusakabe (Kusakabe et al., 1999). In addition, a 24 bp linker coding for FLAG sequence (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) was inserted immediately downstream of the jfTIMP-2 gene.

Within 30 min after fertilization, eggs were collected and their attaching filaments were removed. About 100  $\mu$ l of 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing 1 mM EDTA, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, and plasmid DNA at a concentration of 12.5  $\mu$ g/ml was injected into cytoplasm before first cleavage as described (Kinoshita et al., 1996).

### Detection of Transgene

Polymerase chain reaction (PCR) analysis was performed for detection of the transgene. The template DNA for PCR analysis was prepared from one day old embryo or a part of caudal fin of adult fish as follows. The embryo or fin was incubated with Proteinase K (Wako) solution containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA and 0.1% SDS at 60°C for 18 h. DNA was recovered by phenol/chloroform extraction followed by precipitation with ethanol. The precipitate was dissolved in water and used as the template DNA. PCR was carried out in 20  $\mu$ l solution containing 1.25 units of Ex-taq DNA polymerase (Takara), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM dNTP and 10 pmols of each primer (Fw: TATAGTCGACGATGACCTGGACGGTGAGCA, Rv: TCTGTGCGGCCGCTTACTTGTCAT) designed for the nucleotide sequences in jfTIMP-2b (Fw) and FLAG (Rv). PCR was performed in 30 cycles consisting of 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 1 min. Amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel and stained by ethidiumbromide.



### Establishment of a Transgenic Medaka Line

Microinjected eggs were incubated at 26°C and grown to adulthood to obtain founder fish ( $F_0$ ). The founder fish ( $F_0$ ) were mated with non-transgenic fish and the obtained fertilized eggs were subjected to PCR analysis. The founder fish whose fertilized eggs showed an amplified product with an expected size were determined to be a germ-line-transformed fish ( $F_0$ ). Then, the germ-line-transformed fish ( $F_0$ ) was again mated with non-transgenic fish to produce  $F_1$  offspring. Each  $F_1$  fish was mated with non-transgenic fish and the occurrence of the transgene in the resultant  $F_2$  fish were analyzed by PCR using a part of caudal fin. Selected  $F_2$  transgenic fish were used for the following experiments.

### Confirmation of Transcription and Translation of Transgene

Total RNA was prepared by acid guanidinium-phenol-chloroform methods with Sepazol-RNA I (Nacalai tesque) from the muscle of adult  $F_2$  fish. Total RNA was reverse-transcribed using ReverTra Ace (Toyobo) according to manufacturer's instruction. A part of the reverse-transcription product was used for PCR analysis. The condition and primers was same as those for the detection of the transgene as described above.

Translational product of the transgene was detected by Western blotting. Dorsal muscle excised by a microtome was homogenized with 5 volumes of cold phosphate-buffered saline (137 mM NaCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.68 mM KCl and 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2) and centrifuged at 10,000g for 20 min. The obtained supernatant was subjected to SDS-PAGE (100  $\mu\text{g}$ /each lane) using 10% polyacrylamide gels. Protein concentration was determined by using a Protein Assay Kit (BIO-RAD). Proteins were electrically transferred to a PVDF membrane (Atto). The membrane was blocked with Block Ace (Dainippon Pharmaceutical) and then incubated overnight at 4°C with ANTI-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma) diluted at 1:2000 in Block Ace. The membrane was then incubated with goat anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase (Cell Signaling Technology) for 1 h at room temperature. After washing three times with PBS-T (phosphate-buffered saline containing 0.1 % Tween 20) and once with 100mM Tris-HCl (pH 9.5) containing 100 mM NaCl and 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , the membrane was incubated with color reagents (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, containing 100 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mg/ml nitro blue tetrazolium and 150 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate *p*-toluidine salt). The reaction was stopped by the addition of 10% acetic acid.

## Histological Observation

Dorsal muscle excised from the transgenic and non-transgenic fish by a microtome was wrapped by a thin plastic film and stored at 4°C for 24 h. After storage, muscles were fixed in Bouin fixative. Fixed muscle was dehydrated in ethanol series, and embedded in paraffin was (MP 58-60°C). Thin sections of 7 µm were prepared with a microtome (PR-50 Yamato Koki) and stained with hematoxylin and eosin. Stained sections were observed by a light microscope (Nikon model FX-PH-21).

## RESULTS

### Establishment of a Transgenic Medaka Line Expressing jfTIMP-2

Of thirty injected eggs, only one male raised from these eggs was shown to be germ line transformed by the PCR analysis (data not shown). No apparently disorder was observed for all the transgenic fish including F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>. To investigate the expression of the transgene in the F<sub>2</sub> offsprings, RT-PCR and Western blot analyses were performed by using the muscle tissue. As shown in Fig. 1, a reverse transcribed product was only detected in the F<sub>2</sub> transgenic fish, but not in the non-transgenic fish. By the Western blot analysis using anti-FLAG antibody, expression of jfTIMP-2 protein approximately 25kDa corresponding to an expected size of TIMP-2 was detected only in the F<sub>2</sub> transgenic fish.

Fig. 1

### Histological Observation of Muscle Tissue Stored at Chilled Temperature

To investigate the change in the muscle tissue after chilled storage, histological observation by the light microscopy was performed for the muscle tissues excised from the transgenic F<sub>2</sub> fish and non-transgenic. No apparent difference between the transgenic and non-transgenic fish muscle was observed immediately after death. But after storage for 24 h at chilled temperature, it was clearly demonstrated that the muscle fibers in the transgenic fish were tightly attached (Fig.2-1, 2), while those in the non-transgenic fish were completely detached in most part of muscle tissue (Fig. 2-3, 4).

Fig. 2

## DISCUSSION

Our recent study suggested that the solubilization of collagen from the connective tissue caused by MMPs is responsible for the loss of physical strength of the connective

tissue during chilled storage (Kubota, M et al., 2003). Among MMPs, MMP-9 is a possible candidate implicating in the post-mortem meat tenderization of fish (Kubota, M et al., 2003). Since MMP-9 activity was suggested to be regulated by TIMP-2 (Kubota, S et al., 2003), we set up a hypothesis that the overexpression of TIMP-2 protein in fish muscle using transgenic technology could suppress post-mortem meat tenderization. MMP-9 and TIMP-2 play important roles in the embryonic development (Massova et al., 1998; Nagase et al., 1999), suggesting that ubiquitous expression of TIMP-2 might have harmful effects on it. We therefore made a transgenic medaka line expressing jfTIMP-2 only in the muscle by using muscle actin promoter. As illustrated in Fig. 3, synthesis and breakdown of collagen is supposed to be well balanced in living fish. Nevertheless, the balance of synthesis and breakdown is lost after death due to the elevation of MMP-9 activity possibly induced by the breakdown of TIMP-2/MMP-9 complex. Transgenic overexpression of jfTIMP-2 protein in medaka muscle might suppress meat tenderization after death through the inhibition on medaka endogenous MMP-9 activity *in vivo*.

Fig. 3

As shown in Fig. 1, mRNA and protein of jfTIMP-2 were detected only in the F<sub>2</sub> transgenic fish. This result indicates that the transgene was successfully transcribed and translated in the transgenic fish line. By the histological observation, the muscle fibers in the transgenic fish stored for 24 h remained intact, whereas those in the non-transgenic fish were detached (Fig. 2). This result indicates a possibility that overexpressed jfTIMP-2 protein inhibited the activity of endogenous medaka MMP-9 *in vivo* and the post-mortem breakdown of collagen was suppressed only in the transgenic fish. The present study suggests that the transgenic expression of TIMP-2 in fish muscle possibly improves the quality of fish meat and prolongs the shelf-life of fish by suppressing meat tenderization.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly supported by the Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and the grant from the Bio-Design Project from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan. The authors sincerely appreciate Dr. Takehiro Kusakabe (Himeji Institute of Technology) for the gift of the medaka skeletal muscle actin gene (OlMA1) and Dr. Masashi Ando (Kinki University) for the histological observation.

- Ueda, K., and Tanabe, T. (1997) Evolution of members of the matrix metalloproteinase: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267-283.
- Hacker, P. S. (1993). Molecular Biology Frontiers (ed. By Hoshachika, P. W. and Norrman, T. P.) Elsevier, pp. 207-240.
- Hatao, K., Tobimatsu, A., Takeyama, M., Matsumoto, J.J. (1986). Contribution of the connective tissue on the texture difference of various fish species. *Wapori Sakurui Gakkaishi* 52: 2001-2007.
- Kinoshita, M., and Tanaka, M., (2003) Aquatic Genomics (ed. By Shimizu, N. et al.), pp.316-320.
- Kinoshita, M., Toyohara, H., Sakaguchi, M., Indou, K., Yamashita, S., Saito, M., Wakamatsu, Y., and Ozato, K. (1996) A stable line of transgenic medaka (*Oryzias latipes*) carrying the CAT gene. *Aquaculture* 143: 267-276.
- Kubota, M., Kinoshita, M., Kubota, S., Yamashita, M., Toyohara, H., and Sakaguchi, M. (2001). Possible implication of metalloproteinase in post-mortem tenderization of fish muscle. *Fish Sci* 67: 965-968.
- Kubota, M., Kinoshita, M., Takeuchi, K., Kubota, S., Toyohara, H., and Sakaguchi, M. (2003). Solubilization of type I collagen from fish muscle connective tissue by matrix metalloproteinase-9 at chilled temperature. *Fish Sci* 69: 1053-1059.
- Kubota, S., Kinoshita, M., Uji, S., Yokoyama, Y., Yamamoto, E., Hirono, L., Aoki, T., Sakaguchi, M., Morioka, K., Itoh, Y., and Toyohara, H. (2003). Occurrence of two distinct types of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in teleost fish. *Biochim Biophys Acta* 1629: 102-108.



## REFERENCES

- Ando, M., Toyohara, H., Shimizu, Y., and Sakaguchi, M. (1991). Post-mortem tenderization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle caused by gradual disintegration of the extracellular matrix structure. *J Sci Food Agric* 55: 589-597.
- Brew, K., Dinakarpanian, D., and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 1477: 267-283.
- Hackett, P. B. (1993). Molecular Biology Frontiers (ed. By Hochachka, P. W. and Mommsen, T. P) Elsevier, pp. 207-240.
- Hatae, K., Tobimatsu, A., Takeyama, M., Matsumoto, J.J. (1986). Contribution of the connective tissue on the texture difference of various fish species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 52: 2001-2007.
- Kinoshita, M., and Tanaka, M., (2003) Aquatic Genomics (ed. By Shimizu, N. et al.), pp.320-320.
- Kinoshita, M., Toyohara, H., Sakaguchi, M., Inoue, K., Yamashita, S., Satake, M., Wakamatsu, Y., and Ozato, K. (1996) A stable line of transgenic medaka (*Oryzias latipes*) carrying the CAT gene, *Aquaculture* 143: 267-276.
- Kubota, M., Kinoshita, M., Kubota, S., Yamashita, M., Toyohara, H., and Sakaguchi, M. (2001). Possible implication of metalloproteinase in post-mortem tenderization of fish muscle. *Fish Sci* 67: 965-968.
- Kubota, M., Kinoshita, M., Takeuchi, K., Kubota, S., Toyohara, H., and Sakaguchi, M. (2003). Solubilization of type I collagen from fish muscle connective tissue by matrix metalloproteinase-9 at chilled temperature. *Fish Sci* 69: 1053-1059.
- Kubota, S., Kinoshita, M., Uji, S., Yokoyama, Y., Yamamoto, E., Hirono, I., Aoki, T., Sakaguchi, M., Morioka, K., Itoh, Y., and Toyohara, H. (2003). Occurrence of two distinct types of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in teleost fish. *Biochim Biophys Acta* 1629: 102-108.

# Figure legends

Kusakabe, R., Kusakabe, T., and Suzuki, N. (1999). In vivo analysis of two striated muscle actin promoters reveals combinations of multiple regulatory modules required for skeletal and cardiac muscle-specific gene expression. *Int J Dev Biol* 43: 541-54.

# Fig. 1 Confirmation of transcription and translation of the jTIMP-1 gene in the

Massova, I., Kotra, L.P., Fridman, R., and Mobashery, S. (1998). Matrix metalloproteinases: Structure, evolution, and diversification. *FASEB J* 12: 1075-1095.

# protein in the muscle of F<sub>2</sub> transgenic fish. Detail experimental conditions are described

Nagase, H., and Woessner, Jr, J.F. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-21494.

# Fig. 2 Light microscopic observation of the cross section of uridake muscle (F<sub>2</sub>)

Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., and Shimizu, Y. (1986). Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Nippon Suisan Gakkaishi* 52: 1595-1600.

Toyohara, H., and Shimizu, Y. (1988). Relation of the rigor mortis of fish body and the texture of the muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1795-1798.



**Figure legends**

Fig. 1 Confirmation of transcription and translation of the jfTIMP-2 gene in the transgenic medaka. A: RT-PCR analysis of the expression of jfTIMP-2 mRNA in the muscle of transgenic fish. B: Western blot analysis on the expression of jfTIMP-2 protein in the muscle of F<sub>2</sub> transgenic fish. Detail experimental conditions are described in "Material and Methods".

Fig. 2 Light microscopic observation of the cross section of medaka muscle. 1: F<sub>2</sub> transgenic fish muscle immediately after death. 2: F<sub>2</sub> transgenic fish muscle after storage at 4°C for 24 h. 3: Non-transgenic fish muscle immediately after death. 4 Non-transgenic fish muscle after storage at 4°C for 24 h.

Fig. 3 Schematic illustration of the suppression of muscle tenderization in transgenic fish. Black and white diagrams indicate TIMP-2 and MMP-9, respectively.

Fig. 1  
Toyohara et al.

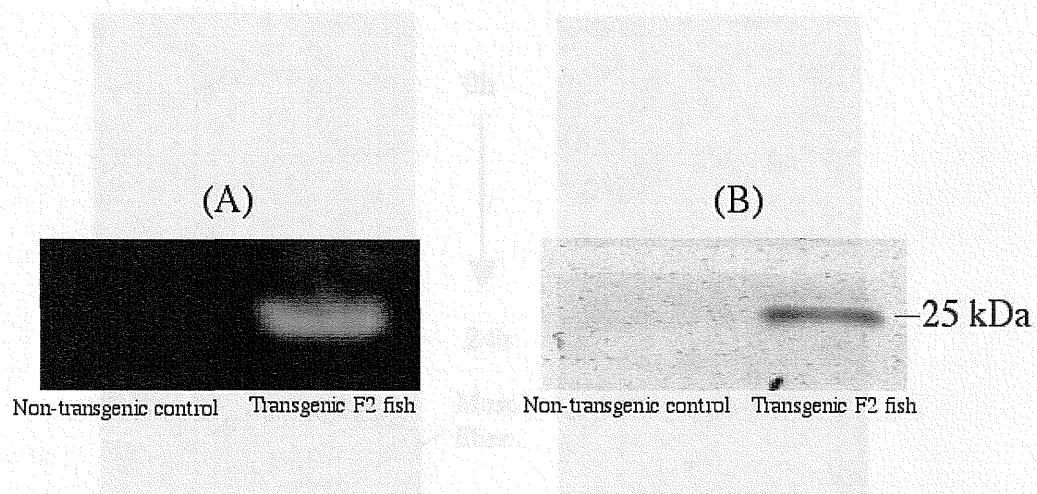


Fig. 2

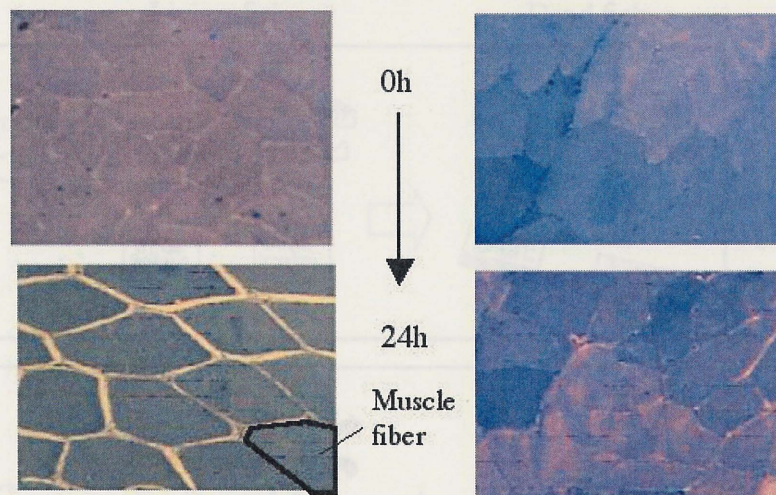
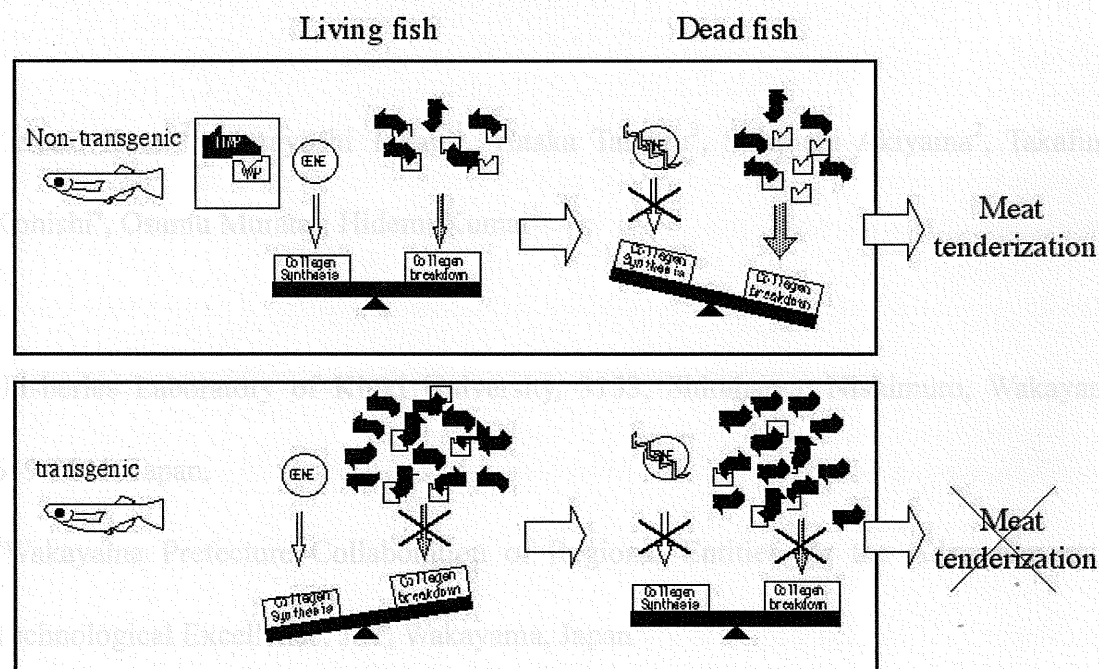


Fig. 3 Construction of an expression vector containing a  $\beta$ -actin promoter region for gene transfer by microinjection in red sea bream, *Pagrus major*



Faculty of Bioresources, Mie University, 1515 Kamihama, Tsu, Mie 514-8507, Japan

<sup>a</sup> School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 1-1,

Asahidai, Tatsunokuchi, Ishikawa 923-1292, Japan.

**Key words:** expression vector,  $\beta$ -actin, microinjection, *Pagrus major*

Corresponding author: Katsuro Kato

TEL: +81-7329-43-2629; FAX: +81-739-42-2634

E-mail: kato@nara.kindai.ac.jp



Construction of an expression vector containing a  $\beta$ -actin promoter region for gene transfer by microinjection in red sea bream, *Pagrus major*

Keitaro Kato<sup>1,2</sup>, Masayoshi Takagi<sup>1</sup>, Yutaka Tamaru<sup>3</sup>, Shin-ichi Akiyama<sup>2</sup>, Takafumi Konishi<sup>4</sup>, Osamu Murata<sup>1</sup>, Hidemi Kumai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fisheries Laboratory of Kinki University, 3153, Shirahama, Nishimuro, Wakayama 649-2211, Japan.

<sup>2</sup>Wakayama Prefecture Collaboration of Regional Entities for the Advancement of Technological Excellence, JST, Wakayama, Japan

<sup>3</sup>Faculty of Bioresources, Mie University, 1515 Kamihama, Tsu, Mie 514-8507, Japan

<sup>4</sup> School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 1-1, Asahidai, Tatsunokuchi, Ishikawa 923-1292, Japan.

**Key words:** expression vector,  $\beta$ -actin, microinjection, *Pagrus major*

Corresponding author: Keitaro Kato

TEL, +81-7329-42-2625; FAX, +81-739-42-2634

E-mail: kei67kato@nara.kindai.ac.jp

**Abstract:** Transgenic technology in fish has been developed mainly in freshwater fish and are of wide application in various fields of life science studies. In commercially important marine finfish, however, there are few reports on transgenic technology. Thus, in this study, we investigated the construction of expression vectors containing a  $\beta$ -actin promoter region for transgenesis in red sea bream (*Pagrus major*). The  $\beta$ -actin genes were cloned from the genomic DNA library of the red sea bream. Recombinant plasmids were constructed, including the 5' and/or 3' flanking region of the gene and the GFP gene. To avoid the effect of chorion stiffening, microinjections were conducted within 5 min. after artificial insemination. Distinct GFP expression in large areas was observed in embryos injected with the plasmids. We therefore successfully constructed the expression vectors for transgenesis in red sea bream.

**Key words:** expression vector,  $\beta$ -actin, microinjection, *Pagrus major*



## 1. Introduction

Genetic engineering can be a powerful tool to develop and improve the traits of fish for aquaculture. In an effort to achieve this goal, transgenic technology has been applied to several farmed freshwater fish species, including carp (Zhu *et al.*, 2000), tilapia (*Oreochromis niloticus*, Martinez, *et al.*, 1996, Hwang, *et al.*, 2003), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*, Devlin, *et al.*, 1994), Atlantic salmon (*Salmo salar*, Shears, *et al.*, 1991), African catfish (*Clarias gariepinus*, Volckaert, *et al.*, 1994), mud loach (*Misgurnus mizolepis*, Nam, *et al.*, 2001), and rohu (*Labeo rohita*, Venugopal, *et al.*, 2004). In commercially important marine finfish, however, there are a few reports on transgenic technology (Zhang, *et al.*, 1998; Lu, *et al.*, 2002).

Red sea bream is one of the most important fish cultured in Japan. To improve the traits of this species, breeding experiments, including mass selection (Murata, *et al.*, 1996), chromosome manipulation (Kato, *et al.*, 2001a; Kato, *et al.*, 2002), and sex control (Kato, *et al.*, 2001b) have been conducted. To develop transgenic technology in a new species, transgenic expression vectors with transcriptional activity in the species have to be constructed. The  $\beta$ -actin promoters from various fish species are reportedly efficient ubiquitous regulators in the field of fish transgenesis (Hwang, *et al.*, 2003; Liu, *et al.*, 1990a; Noh, *et al.*, 2003; Takagi, *et al.*, 1994). In this study, the  $\beta$ -actin gene of red sea bream (*Pagrus major*) was cloned from the genomic DNA library to obtain regulatory sequences useful for transgenic expression vectors. Further, we investigated the expression of these vectors and examined the suitability of microinjection as a

method for delivery of these vectors into fertilized eggs. The DNAs were excised from

the plasmid vector with *EcoRI* and *XbaI* (Stratagene). One plasmid, designated

## 2. Materials and methods

### *Isolation and Sequencing of the red sea bream $\beta$ -actin gene*

Genomic DNA was extracted from the whole blood of a homozygous clone of red sea bream (Kato, *et al.*, 2002). The genomic DNA was partially digested with *EcoR* I, and DNA fragments under 10 kb were purified. The genomic DNA library was constructed using Lambda ZAP II Predigested *EcoR* I / CIAP-Treated Vector Kit with Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) according to the manufacturer's protocol. The titer of the library was  $5.575 \times 10^6$  pfu /  $\mu$ g vector ( $1.115 \times 10^4$  pfu /  $\mu$ l).

Based on sequence information from the  $\beta$ -actin gene of other fish species, the primers Act-F1 and Act-R1 were designed and polymerase chain reaction (PCR) was performed against the ovarian cDNA of a homozygous clone of red sea bream (Kato, *et al.*, 2002). The PCR primers used in this study are shown in Table 1. The PCR products were sequenced and confirmed to have a sequence similar to that of the  $\beta$ -actin genes from other species. The 2 primers Act-F2 and Act-R2 were designed and PCR was performed against the genomic DNA of red sea bream. The 728 bp PCR product, including an intron, was labeled with a DIG DNA Labeling Kit (Roche), and used as a probe. The library was screened by plaque hybridization, and DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche) was used for the detection of positive plaques according to the DIG Application Manual for Filter Hybridization (Roche). The positive plaques were

re-plated and re-screened to obtain a single pure clones. The DNAs were excised from the phage vector with ExAssist helper phage (Stratagene). One plasmid, designated pBS/pmba, contained a DNA fragment of 5,300 bp at the *EcoR* I site of pBluescript SK (-). The DNA sequence of this clone was determined with a CEQ DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter) and CEQ 2000XL (Beckman Coulter).

#### *Construction of red sea bream $\beta$ -actin expression vectors*

The putative structure of the red sea bream  $\beta$ -actin gene and the structure of the gene constructs used in this study are shown in Fig. 1. Green fluorescent protein (GFP) was used as a reporter. An expression vector, pXI-GFP (Knaut, *et al.*, 2002) containing the elongation factor 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) promoter of *Xenopus*,  $\beta$ -globin intron of rabbit, GFP and poly A signal sequence of simian virus 40 (SV 40), was used as a control vector (construct 1). To remove the promoter region of the pXI-GFP, PCR using two primers pXI-F1 and pXI-R1 with KOD -Plus- DNA Polymerase (Toyobo) was performed and the PCR products were purified and dephosphorylated with calf intestine alkaline phosphatase (Toyobo). A 5' flanking region (2,291 bp) of the translated region of the red sea bream  $\beta$ -actin gene was amplified with KOD -Plus- DNA Polymerase (Toyobo) by using primers gActP-F1 and gActP-R1, and ligated into the dephosphorylated fragments mentioned above with TaKaRa BKL Kit (Blunting Kination Ligation Kit, TaKaRa). The constructed plasmids were transformed into *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' strain and then purified (construct 2). To remove the poly A signal sequence of SV 40 of

the construct 2, PCR using two primers pXI-F2 and pXI-R2 with KOD -Plus- DNA Polymerase (Toyobo) was performed and the PCR products were purified and dephosphorylated with calf intestine alkaline phosphatase (Toyobo). A 3' flanking region (685 bp) of the translated region of the red sea bream  $\beta$ -actin gene was amplified with KOD -Plus- DNA Polymerase (Toyobo) by using primers gActPA-F and gActPA-R, and ligated into the dephosphorylated fragments mentioned above with TaKaRa BKL Kit (TaKaRa). The constructed plasmids were transformed into *E. coli* and then purified (construct 3). As a negative control, a plasmid without the 5' flanking region of the translated region of the red sea bream  $\beta$ -actin gene of construct 3 was also constructed (construct 4). The DNA sequences of all constructs were determined to check the reliability of PCR reactions. The DNA concentration of all constructs established with 100 ng /  $\mu$ l of phosphate-buffered saline solution (pH 7.4), and add 1 / 20 volume of 0.1 % phenol red for the confirmation of the transfer of the DNA solution into eggs.

autofluorescence (Figure 2-B), there is a possibility that the weak GFP expression close

*Microinjection* fluorescence region was covered by them. Thus, the number of embryos with

To confirm the *in vivo* function of constructs 2 and 3, microinjection into 150 zebrafish embryos (Meng, *et al.*, 1999) was performed. The eggs and sperm of red sea bream were collected from 6-year-old bloodstocks by the stripping method. To prevent the effect of chorion stiffening, microinjection into red sea bream eggs was conducted within 5 min. after artificial insemination. One minute after insemination, the eggs were washed with seawater and Leibovitz's L-15 Medium (Invitrogen), and then arranged in a



groove on an acryl plate with L-15 Medium. IM-H1 Injection Holder Set (Narishige) with a glass capillary needle and 3 ml disposable plastic syringe was used for the microinjection. The glass capillary needle was pulled and ground using a PC-10 Puller (Narishige) and EG-44 Microgrinder (Narishige), respectively, and the final tip diameter was about 0.05 mm. The injection was conducted under a stereoscopic microscope (Olympus SZX12) by manual pressure of the disposable plastic syringe. Thus, we could not estimate the injection volume. Each construct was injected into 3 replicate lots consisting of 74 to 176 eggs. The injected eggs were incubated in seawater for 3 days at 18°C.

#### Observation of GFP expression

GFP expression was observed under a fluorescence microscope (Olympus, IMT2-RFL) daily for 3 days after injection. As a red sea bream embryo has yellow-colored strong autofluorescence (Figure 2-E), there is a possibility that the weak GFP expression close to the autofluorescence region was covered by them. Thus, the number of embryos with distinct GFP expression was recorded.

#### Statistical analysis

The GFP expression rates (%) were expressed as the means  $\pm$  standard deviations of 3 replicate lots. Fisher's PLSD (Protected Least Significant Difference) test (post-hoc multiple comparison) was used to compare the means among the 4 constructs.

Statistical analysis was performed using a Macintosh computer with the "StatView ver. 5.0" program (developed at SAS Institute Inc., USA).

### 3. Results

#### *Gene structure of the red sea bream $\beta$ -actin gene*

Nucleotide sequence of the chromosomal gene and deduced amino acid sequence of red sea bream  $\beta$ -actin has been determined (DDBJ, AB199890). As described in other fish species (Hwang, *et al.*, 2003; Liu, *et al.*, 1990b; Liu, *et al.*, 1991; Liu, *et al.*, 1990c; Noh, *et al.*, 2003; Takagi, *et al.*, 1994), the 5' flanking region of red sea bream  $\beta$ -actin gene contains a typical CAAT box, a TATA box, and an evolutionary conserved CC(A/T)<sub>6</sub>GG unit, termed CArG motif-like sequences (Figure 1). The coding region consists of 6 exons, while those of carp (Liu, *et al.*, 1990c), medaka (Takagi, *et al.*, 1994), puffer (Venkatesh, *et al.*, 1996) and mud loach (Noh, *et al.*, 2003) have 5 exons. Compared with the amino acid sequence of puffer fish (Venkatesh, *et al.*, 1996), the deduced amino acid sequence of red sea bream differs by three amino acids from beta-cytoplasmic actin 1 and by one amino acid from beta-cytoplasmic actin 2. GenBank accession numbers were as follows: carp M24113, medaka S74868, puffer beta-cytoplasmic actin 1 U37499 and 2 U38848, mud loach AF270649, and tilapia AY116536.

#### *Observation of GFP expression*



The survival rate on the 4 days after injection of the zebrafish embryos injected with construct 2 and 3 were 63 and 53 %, respectively. Distinct GFP expressions were observed in zebrafish embryos injected with both constructs 2 and 3 (Figure 2A, B), and the expression rates were 2.1 and 7.6 %, respectively. This result shows the *in vivo* function of constructs 2 and 3 and indicates the 5' flanking region of the red sea bream  $\beta$ -actin gene has promoter or enhancer activity in zebrafish.

The numbers of surviving and GFP expression embryos of microinjected eggs are shown in Table 2. The survival rates at 3 days after insemination of the non-injected control were over 95% (data not shown). The survival rates of injected eggs ranged from 24.3 to 80.2%, 13.1 to 48.0%, and 7.7 to 40.3% at 1, 2, and 3 days after injection, respectively. The large variation in survival rate may be due to the shape of the tip of the glass capillary needle developed by us. The phenotype of GFP expression in the embryos injected with construct 1-3 are shown in Figure 2.

#### 4. Discussion

Microinjection is the most popular form of gene transfer into fish embryos because of its reliability; however, the rapid hardening of chorions following fertilization interferes with the penetration by injection needles (Hackett, *et al.*, 2000). To overcome this, we performed the injection within 5 min. after the repetition of artificial insemination. In most cases, microinjection was conducted into one-cell embryos. The difference in the expression rate and integration into chromosomes of the transgene between

microinjection into one-cell embryos and embryos just after injection is unknown.

Further research is required.

GFP expressions were observed in embryos injected with construct 1 (Figure 2C).

This shows the transcriptional activity of the *Xenopus* EF1 $\alpha$  promoter in red sea bream embryos, but the expression rates were significantly lower than those of embryos injected with construct 3. GFP expressions were also recognized in embryos injected with constructs 2 and 3, including the 5' flanking region of the red sea bream  $\beta$ -actin gene for 3 days after injection, however, no GFP expression was observed in embryos injected with construct 4 without the region from construct 3. This suggests that the 5' flanking region of the red sea bream  $\beta$ -actin gene used in this study has promoter activity in red sea bream embryos and we successfully constructed an expression vector for transgenesis in red sea bream. GFP expression rates of construct 3 were higher than for construct 2 and the difference was significant at 3 days after injection. This indicates some difference in transcriptional regulation between the poly A signal sequence of SV 40 and the 3' flanking region of the red sea bream  $\beta$ -actin gene.

The GFP expression of embryos injected with constructs 1-3 showed extensive mosaicism (Figure 2A, B, C and E). Its expression in each embryo was patchy and not ubiquitous, with some tissues expressed strongly and some not. Using ubiquitous regulatory sequences, variations in spatial transient expression patterns have also been observed in zebrafish (Stuart, *et al.*, 1990), medaka (Takagi, *et al.*, 1994), and tilapia (Hwang, *et al.*, 2003). The level of expression is probably strongly related to the

transgene copy number present in each cell (Rahman, *et al.*, 2000). Distinct GFP expressions in the yolk syncytial layer in embryos injected with constructs 2 and 3 were also observed (Figure 2A, B and E). Similar observations and explanations were described in zebrafish (Williams, *et al.*, 1996) and tilapia (Hwang, *et al.*, 2003).

## 5. Acknowledgments

We thank the students of the Department of Fisheries, Kinki University at Shirahama Station for their assistance with this study. This work was supported in part by the Wakayama Prefecture Collaboration of Regional Entities for the Advancement of Technological Excellence, Japan Science and Technology Agency, and by a Grant-in-Aid for The 21st Century COE program.

## References

- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Biagi, C.A., Donaldson, E.M., Swanson, P., Chan, W.-K., Liu, 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature* 371, 209-210.
- Hackett, P.B., Alvarez, M.C., 2000. The molecular genetics of transgenic fish. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology Volume 4 Aquaculture Part B Fishes*. Science Publishers, Enfield, pp. 77-145.
- Hwang, G.L., Azizur Rahman, M., Abdul Razak, S., Sohm, F., Farahmand, H., Smith, A., Brooks, C., Maclean, N., 2003. Isolation and characterisation of tilapia beta-actin

- promoter and comparison of its activity with carp beta-actin promoter. *Biochem Biophys Acta* 1625, 11-18.
- Kato, K., Murata, O., Yamamoto, S., Miyashita, S., Kumai, H., 2001a. Viability, growth and external morphology of meiotic- and mitotic-gynogenetic diploids red sea bream, *Pagrus major*. *J. Appl. Ichthyol.* 17, 97-103.
- Kato, K., Hayashi, R., Kasuya, T., Yamamoto, S., Murata, O., Kumai, H., 2001b. Induction of all-male groups in red sea bream, *Pagrus major*, by oral administration of 17  $\alpha$ -methyltestosterone. *Suisanzoshoku* 49, 339-345.
- Kato, K., Hayashi, R., Yuasa, D., Yamamoto, S., Miyashita, S., Murata, O., Kumai, H., 2002. Production of cloned red sea bream, *Pagrus major* by chromosome manipulation. *Aquaculture* 207, 19-27.
- Knaut, H., Steinbeisser, H., Schwarz, H., Nusslein-Volhard, C., 2002. An evolutionary conserved region in the vasa 3'UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish. *Curr Biol* 12, 454-466.
- Liu, Z.J., Moav, B., Faras, A.J., Guise, K.S., Kapuscinski, A.R., Hackett, P.B., 1990a. Functional analysis of elements affecting expression of the beta-actin gene of carp. *Mol Cell Biol* 10, 3432-3440.
- Liu, Z.J., Moav, B., Faras, A.J., Guise, K.S., Kapuscinski, A.R., Hackett, P.B., 1990b. Development of expression vectors for transgenic fish. *Biotechnology (NY)* 8, 1268-1272.
- Liu, Z.J., Moav, B., Faras, A.J., Guise, K.S., Kapuscinski, A.R., Hackett, P., 1991.



- Importance of the CArG box in regulation of beta-actin-encoding genes. *Gene* 108, 211-217. Hwang, O.-L., Razak, S.A., Solmi, F., Maclean, N., 2000. Copy number
- Liu, Z.J., Zhu, Z.Y., Roberg, K., Faras, A., Guise, K., Kapuscinski, A.R., Hackett, P.B., 1990c. Isolation and characterization of beta-actin gene of carp (*Cyprinus carpio*). *DNA Seq* 1, 125-136.
- Lu, J.K., Fu, B.H., Wu, J.L., Chen, T.T., 2002. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar Biotechnol* 4, 328-337.
- Martinez, R., Estrada, M.P., Berlanga, J., Guillen, I., Hernandez, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Pina, J.C., Abad, Z., Sanchez, V., Melamed, P., Lleonart, R., De La Fuente, J., 1996. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol. Mar. Biol. and Biotechnol.* 5, 62-70. G., Ozato, K., Wakamatsu, Y., Takeshita, A., Kimura, M.
- Meng, A., Jessen, J.R., Lin, S., 1999. Transgenesis. *Methods Cell Biol* 60, 133-148. Mar
- Murata, O., Harada, T., Miyashita, S., Izumi, K., Maeda, S., Kato, K., Kumai, H., 1996. Selective breeding for growth in red sea bream. *Fish. Sci.* 62, 845-849. Vari
- Nam, Y.K., Noh, J.K., Cho, Y.S., Cho, H.J., Cho, K.N., Kim, C.G., Kim, D.S., 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res* 10, 353-362. J. Jolita, J. Exp. Zool. A
- Noh, J.K., Cho, K.N., Han, E.H., Kim, A., Lee, J.S., Kim, D.S., Kim, C.G., 2003. Genomic cloning of mud loach *Misgurnus mizolepis* (Cypriniformes, Cobitidae) beta-actin gene and usefulness of its promoter region for fish transgenesis. *Mar*

Biotechnol (NY) 5, 244-252. African catfish (*Clarias gariepinus*). Mol. Mar. Biol.

Rahman, M.A., Hwang, G.-L., Razak, S.A., Sohm, F., Maclean, N., 2000. Copy number related transgene expression and mosaic somatic expression in hemizygous and homozygous transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). Transgenic Res. 9, 417-427. In vitro assays in zebrafish *Danio rerio* embryos. Transgenic Res 3, 413-417.

Shears, M.A., Fletcher, G.L., Hew, C.L., Gauthier, S., Davies, P.L., 1991. Transfer, expression, and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1, 58-63. New York, pp. 13-14.

Stuart, G.W., Vielkind, J.R., McMurray, J.V., Westerfield, M., 1990. Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. Development 109, 577-584.

Takagi, S., Sasado, T., Tamiya, G., Ozato, K., Wakamatsu, Y., Takeshita, A., Kimura, M., 1994. An efficient expression vector for transgenic medaka construction. Mol Mar Biol Biotechnol 3, 192-199.

Venkatesh, B., Tay, B.H., Elgar, G., Brenner, S., 1996. Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes. J Mol Biol 259, 655-665.

Venugopal, T., Anathy, V., Kirankumar, S., Pandian, T.J., 2004. Growth enhancement and food conversion efficiency of transgenic fish *Labeo rohita*. J Exp Zoolog A Comp Exp Biol 301, 477-490.

Volckaert, F.A., Hellemans, B.A., Galbusera, P., Ollevier, F., Sekkali, B., Belayew, A., 1994. Replication, expression, and fate of foreign DNA during embryonic and

Table 1  
PCR primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
Act-F1	larval development of the African catfish ( <i>Clarias gariepinus</i> ). Mol. Mar. Biol. And Biotechnol. 3, 57-69.
Act-R1	
Act-F2	
Act-R2	
Act-F3	
Act-R3	
Act-F4	
Act-R4	
Act-F5	
Act-R5	
Act-F6	
Act-R6	
Act-F7	
Act-R7	
Act-F8	
Act-R8	
Act-F9	
Act-R9	
Act-F10	
Act-R10	
Act-F11	
Act-R11	
Act-F12	
Act-R12	
Act-F13	
Act-R13	
Act-F14	
Act-R14	
Act-F15	
Act-R15	
Act-F16	
Act-R16	
Act-F17	
Act-R17	
Act-F18	
Act-R18	
Act-F19	
Act-R19	
Act-F20	
Act-R20	
Act-F21	
Act-R21	
Act-F22	
Act-R22	
Act-F23	
Act-R23	
Act-F24	
Act-R24	
Act-F25	
Act-R25	
Act-F26	
Act-R26	
Act-F27	
Act-R27	
Act-F28	
Act-R28	
Act-F29	
Act-R29	
Act-F30	
Act-R30	
Act-F31	
Act-R31	
Act-F32	
Act-R32	
Act-F33	
Act-R33	
Act-F34	
Act-R34	
Act-F35	
Act-R35	
Act-F36	
Act-R36	
Act-F37	
Act-R37	
Act-F38	
Act-R38	
Act-F39	
Act-R39	
Act-F40	
Act-R40	
Act-F41	
Act-R41	
Act-F42	
Act-R42	
Act-F43	
Act-R43	
Act-F44	
Act-R44	
Act-F45	
Act-R45	
Act-F46	
Act-R46	
Act-F47	
Act-R47	
Act-F48	
Act-R48	
Act-F49	
Act-R49	
Act-F50	
Act-R50	
Act-F51	
Act-R51	
Act-F52	
Act-R52	
Act-F53	
Act-R53	
Act-F54	
Act-R54	
Act-F55	
Act-R55	
Act-F56	
Act-R56	
Act-F57	
Act-R57	
Act-F58	
Act-R58	
Act-F59	
Act-R59	
Act-F60	
Act-R60	
Act-F61	
Act-R61	
Act-F62	
Act-R62	
Act-F63	
Act-R63	
Act-F64	
Act-R64	
Act-F65	
Act-R65	
Act-F66	
Act-R66	
Act-F67	
Act-R67	
Act-F68	
Act-R68	
Act-F69	
Act-R69	
Act-F70	
Act-R70	
Act-F71	
Act-R71	
Act-F72	
Act-R72	
Act-F73	
Act-R73	
Act-F74	
Act-R74	
Act-F75	
Act-R75	
Act-F76	
Act-R76	
Act-F77	
Act-R77	
Act-F78	
Act-R78	
Act-F79	
Act-R79	
Act-F80	
Act-R80	
Act-F81	
Act-R81	
Act-F82	
Act-R82	
Act-F83	
Act-R83	
Act-F84	
Act-R84	
Act-F85	
Act-R85	
Act-F86	
Act-R86	
Act-F87	
Act-R87	
Act-F88	
Act-R88	
Act-F89	
Act-R89	
Act-F90	
Act-R90	
Act-F91	
Act-R91	
Act-F92	
Act-R92	
Act-F93	
Act-R93	
Act-F94	
Act-R94	
Act-F95	
Act-R95	
Act-F96	
Act-R96	
Act-F97	
Act-R97	
Act-F98	
Act-R98	
Act-F99	
Act-R99	
Act-F100	
Act-R100	

Williams, D.W., Muller, F., Lavender, F.L., Orban, L., Maclean, N., 1996. High transgene activity in the yolk syncytial layer affects quantitative transient expression assays in zebrafish *Danio rerio* embryos. Transgenic Res 5, 433-442.

Zhang, P., Yongli, X., Zongzhu, L., Xiang, Y., Du, S., Hew, C.L., 1998. Gene transfer in red sea bream (*Pagrosomus major*). In: Gal, Y.L., Halvorson, H.O. (Eds.), New Developments in marine biotechnology. Plenum Press, New York, pp. 15-18.

Zhu Z.Y., SUN Y.H., 2000. Embryonic and genetic manipulation in fish. Cell Res 10, 17-27.

Table 1  
PCR primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
Act-F1	GARAARATGACNCA
Act-R1	DATYTCYTTYTGCA
Act-F2	CAGGTATTGTGTTGGACTCTGGTG
Act-R2	GATGTCCACGTCGCACTTCATG
pXI-F1	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
pXI-R1	GCCGGTCTCCCTATAGTGA
gActP-F1	AATTCCTAGTGTAAGTTTATGAGTCTTT
gActP-R1	TTTCTGGACAGAGAGGGAGA
pXI-F2	TATAGTGTACCTAAATCGTATGTGTAT
pXI-R2	TTACTTGTACAGCTCGTCCATG
gActPA-F	ACGAACTGTCAGTCCCCTC
gActPA-R	AATTCAGCCATCAAGAATTTCTTCTTTAGA

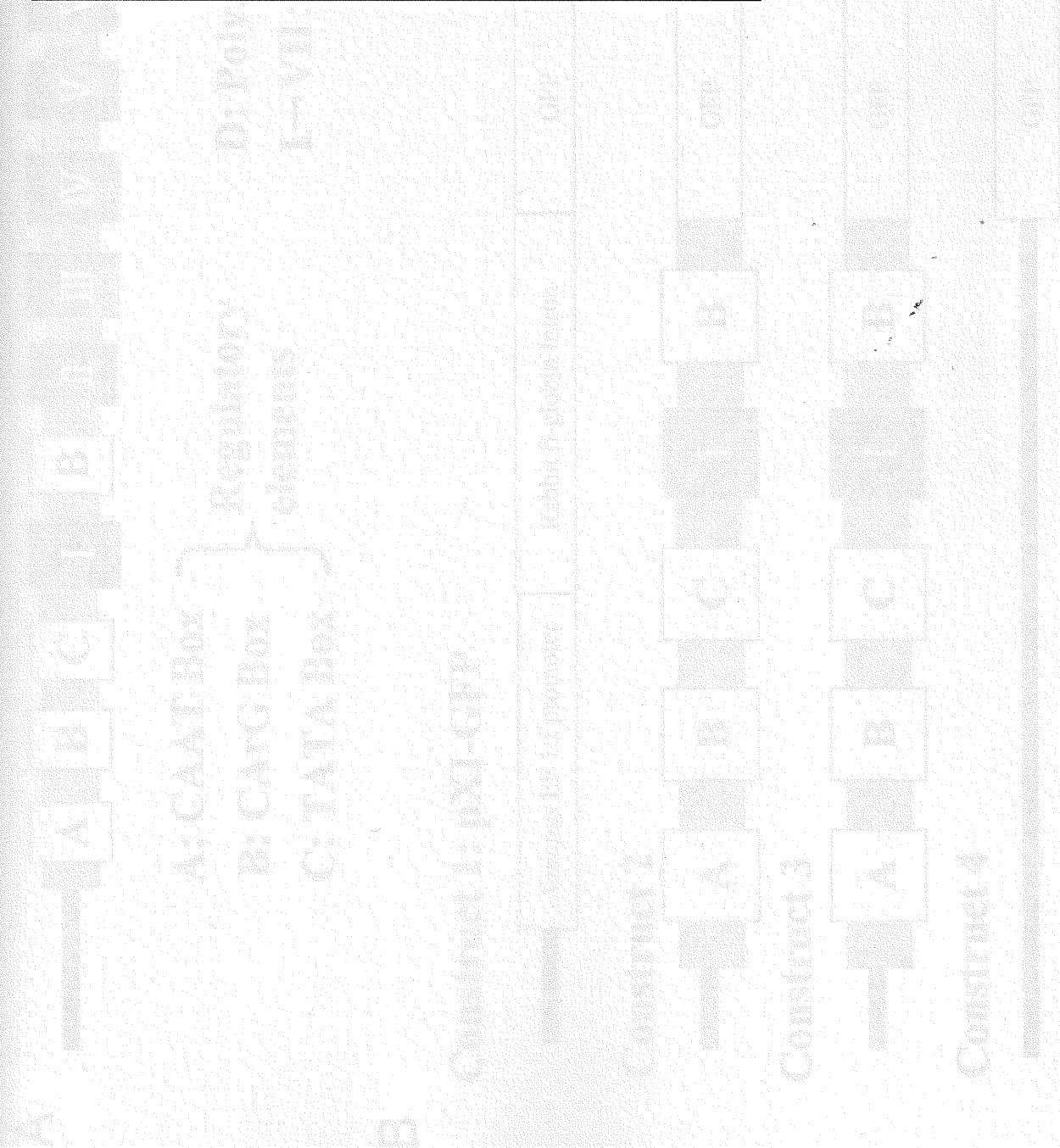
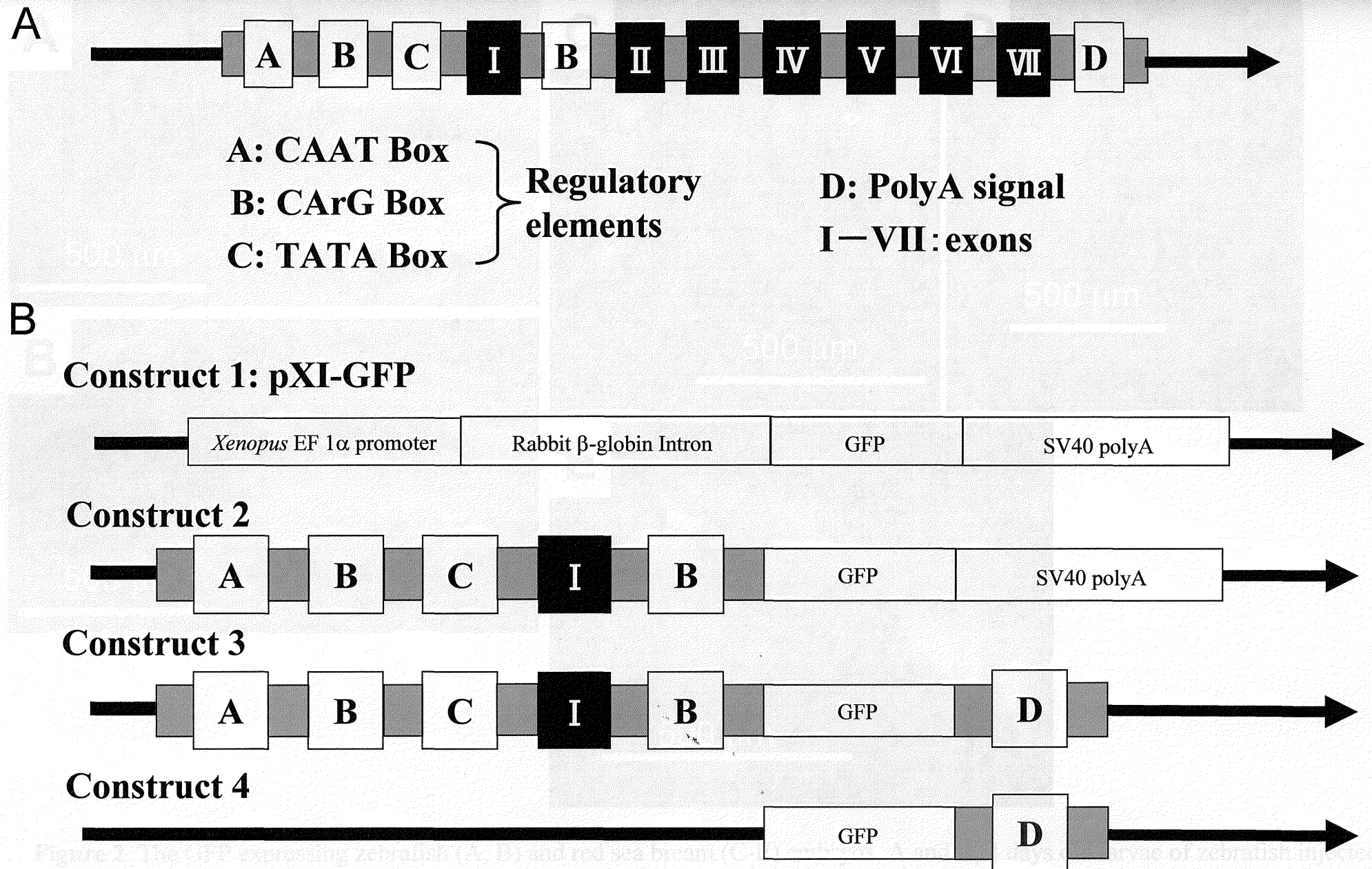


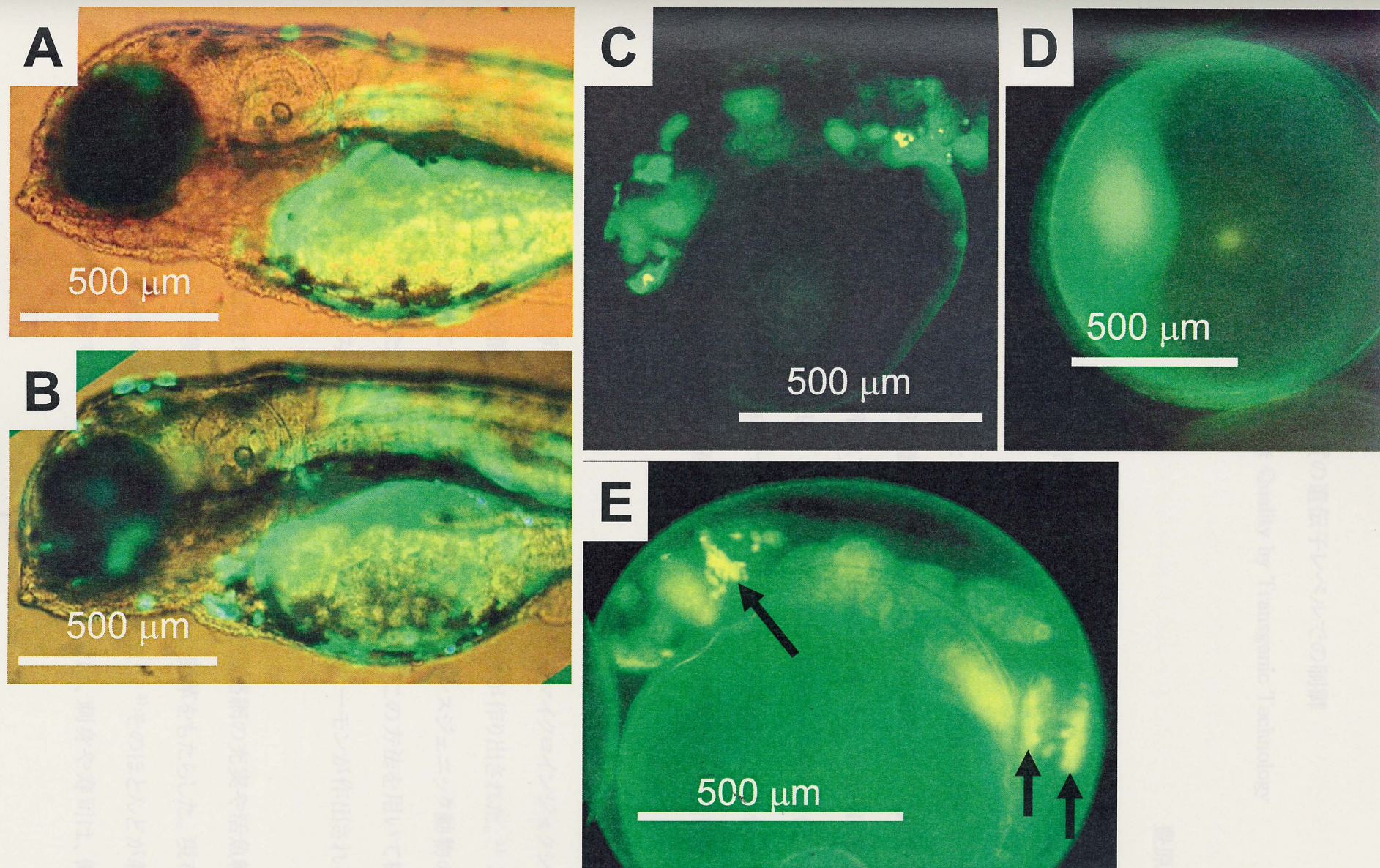
Figure 1. The relative structure of the rat  $\beta$ -casein gene (A) and the structure of the pXI construct used in this study (B).





**Figure 1.** The putative structure of the red sea bream  $\beta$ -actin gene (A) and the structure of the gene construct used in this study (B).





**Figure 2.** The GFP expressing zebrafish (A, B) and red sea bream (C-E) embryos. A and B, 4 days old larvae of zebrafish injected with construct 2 (A) and 3 (B); C, embryos at 42 hours after insemination injected with construct 1; D, embryos at 20 hours after insemination injected with construct 2; E, embryos at 42 hour after insemination injected with construct 3. Arrows show the embryo's autofluorescence.



## 養殖魚の肉質の遺伝子レベルでの制御

### Regulation of Fish Meat Quality by Transgenic Technology

豊原治彦\*

\*Haruhiko Toyohara 京都大学 農学研究科 応用生物科学専攻 助教授

養殖魚の大半は、刺身や寿司ネタとして生(なま)で食される。生食においては、肉の歯ごたえが品質を決定するもっとも重要な要素であるが、畜肉とくらべて魚の筋肉は死後の軟化が速やかであり、養殖魚では特にその傾向が著しい。筆者らは軟化抑制に重要な役割を果たす遺伝子として TIMP-2 を同定し、個体レベルの遺伝子組換えであるトランスジェニック技術を用いて、モデル実験としてメダカにこの遺伝子を過剰発現させることにより、魚類の肉質を遺伝子レベルで制御できることを見出した。

#### 1. はじめに

1982年に、マウスの卵にラットの成長ホルモン遺伝子をマイクロインジェクションすることにより、通常の約2倍の体重を持つジャイアントマウスが作り出された。<sup>1)</sup> この実験は、外来遺伝子を単に物理的に卵に注入することでトランスジェニック動物の作出が可能であることを示した画期的な研究であった。その後、この方法を用いて様々な動物で同様の実験が試みられ、1994年にはジャイアントサーモンが作出されるにいたった。<sup>2)</sup>

一方、1960年代にはじまった海産魚の養殖は、高速道路網の充実や活魚輸送技術の発達とあいまって、我が国の魚の消費形態に大きな変革をもたらした。現在では、マダイやブリでは生産量の大半が養殖魚で占められており、<sup>3)</sup> そのほとんどが刺身や寿司ネタとして生(なま)で食べられている。さらに最近では、刺身や寿司は、健康志

向ブームの影響から欧米でも受け入れられるようになり、海外で寿司屋を見かけることもそう珍しいことではなくなってきた。

魚の生食において、いわゆるコリコリとした歯ごたえはその品質を決定する最大の要素であるが、一般に魚の肉質は牛肉などの畜肉と比較して軟らかく、しかも死後その硬さは急激に低下する。<sup>4, 5, 6)</sup> このように魚肉はたとえ低温でも死後、筋肉の軟化が速やかに進行するために鮮度がきわめて重要であり、売り場においてのシェルフライフは他の食品にくらべてきわめて短い。本稿では、筆者らがこれまで行ってきた魚肉の軟化機構に関する研究結果と、トランスジェニック技術を用いた遺伝子レベルにおけるその抑制方法について概説する。

## 2. 魚の肉質を決める要素

私たち日本人は生の魚を食べるとき、「鮮度のよい魚ほど歯ごたえがよくておいしい」という食感を無意識のうちに重視している。これは、魚は鮮度がよいほど歯ごたえがしっかりしているため、歯ごたえのよさが高品質の象徴として、日本人の中に広く受け入れられているためである。余談ではあるが、刺身や寿司などの魚の生食は最近では欧米でもかなり普及しているが、彼らに歯ごたえの話をする、多くの欧米人から「刺身の歯ごたえは、硬いのと軟らかいのとではどちらがよいのか」といった質問を受ける。このことから判断して、彼らはコリコリとした生の魚肉の歯ごたえを、必ずしも品質を決定する重要な要素とは考えていないようである。このことは、「新鮮な魚＝コリコリした歯ごたえ＝おいしい」という感覚が、決して先天的な感覚ではなく、日本人が後天的に学習したものであることを裏付けている。

ところで、新鮮な魚肉が持つ歯切れのよさは、魚肉の持つどのような構造に由来するのだろうか。実は、コリコリとした歯ごたえを感じるためには軟らかすぎても硬すぎてもだめで、両者の構造が不連続に重なり合っていることが重要である。それでは魚肉において硬い構造体と軟らかい構造は、どのような構造体に相当するだろうか。図1に魚



の筋肉の構造を示した。焼き魚や煮魚を食べるとき、魚肉を箸でつまむと一定の幅のW字型にほぐれてくることがある。これは魚の筋肉がW字型の一定の厚さの構造が集まってできているからである。このW字の境界にあたる白い筋を筋隔膜とよぶ。筋隔膜と筋隔膜の間はたくさんの筋繊維(筋細胞)で連結されている。これらの筋繊維は収縮・弛緩することで泳ぐために重要な働きをしており、各筋繊維どうしは筋内膜という構造でしっかり接着されている。筋隔膜や筋内膜は結合組織とよばれ、コラーゲンを主成分とする体液に不溶な一群のタンパク質から構成されている。<sup>7)</sup>

このように魚肉は、大別して結合組織と筋繊維の2種類の構造からなるが、前述の硬い構造体と軟らかい構造体はそれぞれどちらに相当するのだろうか。この問題の解答を得るために、魚肉に人為的に荷重を加え、肉の中のどの部分が壊れているかを顕微鏡で詳しく調べた。その結果、荷重により最初に破壊されるのは結合組織であることがわかった。<sup>6)</sup> このことは、軟らかい構造体に相当するのは結合組織であり、硬い構造に相当するのが筋繊維であることを意味している。つまり歯で刺身を噛むと、歯に加えた力より結合組織の弾力が勝っている間は弾力が感じられ、歯に加えた力がついにその弾力を上回ると、歯が一気に肉に食い込んでいき、コリコリした歯切れのよい感触を感じることができるわけである。

図2に、冷蔵中におけるさまざまな魚類筋肉の破断強度の変化を示した。このようにたいていの魚の筋肉は、死後、速やかに軟化するが、その原因は、生きている時にはしっかりした物理的強度を保っていた結合組織が、死ぬとその強度を失うことに原因する。<sup>6-10)</sup> 実際、図3に示すように即殺直後と24時間冷蔵後のマイワシの筋内膜の構造を比較してみると、24時間後には明らかにその構造が薄く脆弱化していることがわかる。前述したように、結合組織の主成分はコラーゲンというタンパク質である。コラーゲンはきわめて多くの分子種からなることが知られているが、魚肉の結合組織は、I型、IV型、V型の各コラーゲンから構成されと考えられている。<sup>11, 12)</sup> 筋繊維は基底膜とよばれる膜状のIV型コラーゲンからなるシートでおおわれ、基底膜はV型コラーゲン

を介して繊維状の I 型コラーゲンにつなぎとめられているものと推測される。量的には圧倒的に I 型コラーゲンが多く、IV 型と V 型はごく微量にすぎないことから、図2で観察される結合組織のほとんどは、I 型コラーゲンからなると考えられる。したがって、冷蔵中に筋内膜の構造が目に見えて薄くなっていくのは、I 型コラーゲンが溶け出して失われていることを意味している。I 型コラーゲンの可溶化は低温度条件下でも時間依存的に進行することから、何らかの酵素学的反応に原因すると予想された。筆者らは I 型コラーゲンの可溶化は、I 型コラーゲンを基底膜の IV 型コラーゲンにつなぎとめている V 型コラーゲンの酵素的分解によるものと推測し、その原因酵素の特定を試みた。

コラーゲンなどの結合組織を構成するタンパク質を分解する酵素としては、マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix Metalloproteinase, 以下 MMP と略す) が知られている。<sup>13-14)</sup> MMP はもともとオタマジャクシがカエルへと変態するときに、尾のコラーゲンを分解する酵素として発見されたものであるが、その後、癌細胞の転移や生物の初期発生過程における形態形成において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。現在では基質特異性などの違いから、20種類以上の MMP 遺伝子がヒトからクローニングされている。これらの MMP のうち、筆者らは V 型コラーゲンに対して分解活性を示す MMP-9 に注目し、ヒラメからその cDNA をクローニングした。<sup>15-16)</sup> 昆虫細胞を用いてその組換え体を作製し、別に調製した粗結合組織画分に低温度条件下で作用させたところ、死後の筋肉でみられるのと同様、I 型コラーゲンの可溶化が認められた。<sup>17)</sup> この実験結果から、筆者らは MMP-9 が I 型コラーゲン可溶化の原因酵素であると判断し、その活性抑制が魚肉の品質向上を図る上で重要であると考えた。MMP-9 はシグナルペプチドを持つプレプロ型前駆体として合成され、シグナルペプチドが切断されプロ型酵素が細胞外へ分泌された後にもアミノ末端側に存在するシステインスイッチとよばれる領域が、活性を抑制していると考えられている。活性発現にはこのシステインスイッチの解除が必要で、解除にはシステインスイッチ領域の自己触媒的な切断が関わっていることが予想されている。このような自己活性化の調節には、内因性の

MMP 阻害タンパク質である Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (以下 TIMP と略) が関わっており、これまでヒトでは TIMP1-4 の4種類の TIMP 分子種の存在が知られている。<sup>18-19)</sup> 筆者らはヒラメからこれら TIMP 遺伝子のクローニングを試み、2種類の TIMP-2 (以下 TIMP-2a と TIMP-2b) の cDNA を得た。<sup>20)</sup> 両 TIMP-2 の組換え体を作製し、試験管内において MMP-9 活性の阻害能を調べたところ、両 TIMP-2 ともに阻害活性を示したが、TIMP-2b の方がより強い阻害活性を示した。そこで TIMP-2b を導入したトランスジェニック魚を作れば、肉質の優れた魚ができるのではないかという着想に至った。この実験結果について述べる前に、次項でまずトランスジェニック魚の作出方法について概説したい。

### 3. トランスジェニック魚の作出方法

トランスジェニック魚を作り出す手順は、1. 導入遺伝子の選択、2. 発現ベクターの作製、3. 発現ベクターの受精卵への導入、4. 交配などによる導入遺伝子の固定、の4ステップからなる。<sup>21)</sup> まず、導入すべき遺伝子が決まれば、それを発現ベクターに組み込む。発現ベクターには、大腸菌の中で増幅するプラスミドとしての機能に加え、トランスジェニック魚において導入遺伝子の発現調節に関わる機能が含まれている。発現を調節する機能は発現ベクター中のプロモーターにより支配されており、通常、導入遺伝子を構成的に常時発現させるのか、あるいは特定の組織で(場合によっては特定の刺激に応答して)発現させるのかという情報を規定している。構成的な発現誘導には哺乳類などでも用いられるウイルス由来のプロモーターに加え、 $\beta$ -アクチンやペプチド伸長因子など構成的な発現をするタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域が用いられる。一方、組織特異的な発現誘導には、特定の組織で発現しているタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域(例えば次項で述べるような筋肉特異的な発現には  $\alpha$ -アクチンのプロモーター)が利用される。理想的には、このようなプロモーターとしては導入対象魚から得られたものが望ましいが、魚種が異なっても

うまく機能することが多い。このようにして構築した発現ベクターを、次に通常は受精卵（場合によっては未受精卵や精子）に導入する。そのための方法としては、細いガラス管による注入（マイクロインジェクション）が一般的に用いられるが、電気処理により一時的に卵に小さな穴を開けて入れる方法（エレクトロポレーション）、金のきわめて小さな粒に発現ベクターをまぶして散弾銃のように打ち込む方法（ジーンガン）、ウイルスを使って感染させる方法（ウイルスベクター法）など種々の方法も開発されている。<sup>22)</sup>

いずれの方法を用いるにせよ、トランスジェニック魚を作り出すにあたってもっとも重要なことは、次世代に導入遺伝子を伝達させるために、遺伝子導入した卵から発生した個体が成熟したときに、その配偶子（メスなら卵、オスなら精子）の染色体遺伝子に導入遺伝子が組み込まれていることである。実際には、1細胞期の受精卵に発現ベクターを打ち込んでも、その遺伝子が染色体に組み込まれるのは細胞がかなり増殖してからになる。組み込みのメカニズムについてはよくわかっていないが、おそらく、染色体DNAの組換えの際に取り込まれたり、ある種の転移因子を介して組み込まれたりするものと予想される。発生の途中段階で、あるひとつ細胞の染色体に偶然に導入遺伝子が組み込まれれば、その細胞の増殖、分化によって生じるそれ以降の世代の細胞群にはすべて導入遺伝子が分布することになる。その結果、この魚の体内には、導入した遺伝子を持つ細胞がモザイク状に点在することになる。したがって、もし仮に遺伝子導入魚がメスだとすると、卵巣内にも導入遺伝子を持つ細胞がモザイク状に分布する可能性がある。その場合、すべての卵が導入遺伝子を持つわけではないので、そのメスから生まれてくる子供すべてには導入遺伝子が伝わらない。そのため、その卵から孵化した子供を成魚まで育て、導入遺伝子を持つ個体を選別し、さらに交配を繰り返すことにより導入遺伝子を遺伝的に固定する必要がある。

#### 4. 限定 遺伝子組換えによる肉質の向上

すでに述べたように、魚肉の歯ごたえは結合組織の物理的強度に依存し、冷蔵中



の軟化はその強度の低下に原因すること、生化学的にはこの現象は MMP-9 による結合組織タンパク質の分解反応であることが明らかとなった。MMP-9 の活性は、生体内ではその内因性インヒビター TIMP-2 により制御されているが、死後、その抑制がはずれることで MMP-9 の活性が制御できなくなり、その結果、結合組織コラーゲンの可溶化が起こるものと予想される。筆者は、この現象は個体の死の結果おこる血流の停止がもたらす生理的応答現象の延長にあるものと考えている。局所的には、筋肉組織において血流の停止は、低酸素、低栄養、あるいはある種の成長因子の供給停止などをもたらす。これは、生理的には失血やそれに引き続いておこる傷の修復機構と同様の応答現象を誘起するものと推測される。TIMP-2 と MMP-9 が解離し、MMP-9 が結合組織タンパク質を分解する反応は、このような一連の現象に含まれるひとつの生化学的過程と理解できる。

MMP-9 と TIMP-2 の結合と解離がどのように制御されているのかはまったくわからないが、前述のように組換え体を用いた実験から TIMP-2b が効果的に MMP-9 活性を阻害することが確認されたことから、トランスジェニック技術を用いて TIMP-2b を過剰発現させることで MMP-9 の活性を抑制させることができるかもしれないとの仮説を立てた。図4に示すように、通常の野生種の筋肉組織においては生体内ではコラーゲンの合成と分解はバランスのとれた状態にあるが、死後、MMP-9 が活性化されることによりそのバランスは分解に傾いてしまう。しかし、TIMP-2b を過剰発現させたトランスジェニック魚の筋肉組織では、生体内においても MMP-9 の活性は抑制されているため、コラーゲン合成が分解を上回り、結果として肉質の向上につながることが期待される上に、死後においても、大過剰に存在する TIMP-2b が MMP-9 の活性を抑制することから、軟化が抑制されと考えられる。しかし、一方でこのように TIMP-2b を過剰発現させると、さまざまな弊害も生じることが予想されることから、筆者らは、その発現を筋肉だけに限定する工夫を行った。具体的には、小型実験魚として取り扱いやすいメダカを用いて、<sup>23, 24)</sup>  $\alpha$ -アクチンという筋肉だけに発現しているタンパク質をコードする遺伝子

のプロモーター領域(日下部岳広博士よりご供与)にヒラメ TIMP-2b 遺伝子を結合した発現ベクターを用いた。

図5にヒラメ TIMP-2b 遺伝子導入メダカの作出手順を示した。メダカ受精卵にマイクロインジェクションによりこの発現ベクターを注入し、孵化、成長させ  $F_0$  を得た。前項に述べたように、 $F_0$  では体内にヒラメ TIMP-2b 遺伝子を持つ細胞がモザイク状に分布しているため、もし、導入遺伝子が染色体 DNA にうまく組み込まれているとしても、生殖細胞においてすべての卵や精子がヒラメ TIMP-2b 遺伝子を持つわけではない。そこで、成熟した  $F_0$  を野生種と交配し、得られた受精卵について PCR 分析を行い、増幅が認められた受精卵を産んだ親を、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子が染色体 DNA に組み込まれた  $F_0$  として選別した。この  $F_0$  (雄) の精子には一部にはあるが、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子が染色体 DNA に組み込まれたものが存在するので、その精子で野生種の雌から採取した卵を受精させて生まれた  $F_1$  世代の子供には、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子が最初から組み込まれていることになる。ここで重要なことは、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子を持つ  $F_1$  世代は、1細胞の受精卵の段階ですでにヘテロではあるがヒラメ TIMP-2b 遺伝子を持っているということである。したがって、この受精卵から生じた  $F_1$  の成魚は、生殖細胞も含め全身すべての細胞にヒラメ TIMP-2b 遺伝子を持っていることになる。このように  $F_1$  の生殖細胞すべてにヘテロにヒラメ TIMP-2b 遺伝子が存在しているので、この  $F_1$  と野生種との交配で生まれた次世代  $F_2$  には、理論的には50%の個体にヒラメ TIMP-2b 遺伝子が存在していることになる。実際、 $F_2$  個体の尾ビレの一部を切り取り(尾ビレを用いるのは、その個体を殺さずに導入遺伝子の有無を調べるため)、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子の存在を PCR で調べたところ、およそ半分の個体にその存在が確認された。そこで、遺伝子導入が確認された  $F_2$  を用いて、これらの個体でヒラメ TIMP-2b 遺伝子が実際に転写、翻訳されているのかを検討した。

PCR 分析でヒラメ TIMP-2b 遺伝子の存在が確認された  $F_2$  個体から mRNA を調製し、それを逆転写して得た cDNA についてヒラメ TIMP-2b 遺伝子の転写産物の有無を

PCR 分析で調べたところ、トランスジェニック個体においてのみ、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子の転写産物が検出された。さらにその翻訳産物であるタンパク質についてウエスタンブロット分析を行ったところ、mRNAと同様、トランスジェニック個体においてのみその発現が確認された。これらの結果は、人為的に導入したヒラメ TIMP-2b 遺伝子が F<sub>2</sub> 世代の個体において、正常に転写、翻訳されていることを証明するものであった。さらに、ヒラメ TIMP-2b タンパク質の筋肉における発現について免疫組織学的に検討したところ、興味深いことに、すべての筋肉細胞について一様のレベルで発現しているのではなく、特に小型の筋肉細胞で高いレベルで発現していることが明らかとなった。この事実は、このような小型細胞は筋肉細胞として若い細胞であり、そのため  $\alpha$ -アクチンの発現も高いレベルにあることが予想され、その結果、そのプロモーターにより発現が誘導されるヒラメ TIMP-2b タンパク質についても高いレベルで発現していることを示唆している。

前述したように、魚の肉質を決定する鍵は結合組織の物理的強度にある。そこで、非導入魚とヒラメ TIMP-2b 遺伝子導入魚の筋肉組織についてそれぞれ切片を作製し、組織学的観察を行った。非導入魚の筋肉を冷蔵庫で24時間貯蔵後に作製した切片では、ほとんどの筋繊維が筋内膜部分で分離していたが、興味深いことに、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子導入魚の筋肉では、24時間貯蔵後に作製した切片でも筋繊維の分離は認められなかった。この事実は、ヒラメ TIMP-2b タンパク質がメダカ MMP-9 の活性を阻害し、その結果、トランスジェニック魚で筋内膜の強度低下が軽減された可能性を示している。メダカで可能なことは、基本的にはすべての魚類に適応可能であることから、TIMP-2b 遺伝子を強制発現させることで、養殖魚の肉質を改善することが可能と考えられる。マダイなどの有用海産魚ではすでにクローン魚作製技術が確立していることから、一旦、遺伝子導入に成功すれば、この技術を用いて肉質の優れたクローン魚を作り出すことは難しいことではない。野生種との交雑を完全に防止できる隔離されたエリアで、このような遺伝子組換え魚を養殖することは、法的な基盤、社会的なコンセンサスが得られれば、すでに技術的には可能なレベルに達しているといえるだ

ろう。

## 5. 今後の課題

TIMP-2 は MMP-9 活性の制御のほかに様々な生物機能を有していることが予想される。したがって、その過剰発現は、発生初期の形態形成など種々の生物現象に悪影響を及ぼすことが懸念される。実際、最初に遺伝子導入を行った  $F_0$  の孵化率や生残率は他の外来遺伝子を導入した場合にくらべて低く、正常に孵化しても遊泳能力に異状がみられる個体も多かった。そのためこの実験では、正常な生殖能力を持つ  $F_0$  を 1 尾しか得ることができなかった。これらの  $F_0$  では、おそらくヒラメ TIMP-2b 遺伝子の発現量が異常をもたらすレベル以下であったため、正常に発生・成熟のプログラムが進行したものと考えられる。このように、同じようにマイクロインジェクションによって外来遺伝子を導入しても、個体によってその発現レベルに違いが生じることが多い。これは、染色体 DNA における組み込まれた位置の違いによると推測されている。導入遺伝子の発現は、偶然に組み込まれた部位の近辺に存在する発現調節に関わる遺伝子配列に大きく影響されるからである。現時点では、外来遺伝子の導入部位について制御することは困難であるが、導入標的部位の近傍の塩基配列を利用した相同組換えにより、近い将来、ピンポイントでねらった部位に外来遺伝子を導入することが可能になると予想される。相同組換えはその組換え頻度がきわめて低いため、受精卵へのマイクロインジェクションなどによる導入では、ねらい通りに組換えが起こった卵を得ることは不可能である。そのためマウスでは分化全能性を持つ ES 細胞が用いられている。魚類においても ES 細胞株の樹立がこれまで試みられてきたが、もっとも肝心のポイントである生殖細胞への分化能を保持させた株の樹立に成功していない。その意味から、本特集にある吉崎らが開発しつつある始原生殖細胞の株化に大きな期待が寄せられている。

最後に、本稿を発表する機会を与えていただいた近畿大学の家戸敬太郎先生に



御礼申し上げますとともに、共同研究者である木下政人、高木雅也(京都大学)、廣野育夫、青木宙(東京水産大学)、日下部岳広(姫路工業大学)、久保田賢(高知大学)、安藤正史(近畿大学)、鈴木徹(独立行政法人水産研究センター)の各氏に感謝申し上げます。なお、本研究の一部は、文部科学省科学研究費「基盤研究(B)(2)」と農林水産庁委託事業費「形態・生理機構の改変による新農林水産生物の創出に関する総合研究」によっています。

3. 藤井英水、澤田好史、海産魚製氷産業の現状と課題、「最新海産魚の養殖」(藤井英水編)、廣文社、2-16(2000)
4. 豊原治彦、志水寛、魚体の死後硬直と魚肉の物性の関係、日本水産学会誌、54、1795-1798(1988)
5. 豊原治彦、安藤正史、魚肉の物性変化、「水産学シリーズ86(魚類の死後硬直)」(山中英明編)、恒星社厚生閣、42-49(1991)
6. 豊原治彦、魚介類のアクスタチャー、シリーズ食品の科学「魚の科学」(藤原寛二監修、阿部宏喜・福家真也編)、朝倉書店、79-86(1994)
7. 豊原治彦、魚介類の組織、「水産食品の事典」(竹内昌昭、藤井達夫、山岸正明編)、朝倉書店、98-104(2000)
8. 豊原治彦、魚肉のアクスタチャー「おいしさの事典」(山野善正編)、朝倉書店、268-273(2003)
9. 安藤正史、魚肉の軟化機構、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村 茂編)、恒星社厚生閣、73-82(1997)
10. 佐藤健司、魚肉の冷蔵とI型コラーゲン、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村 茂編)、恒星社厚生閣、83-90(1997)
11. 木村 茂、魚類のコラーゲン、「水産動物筋肉タンパク質の比較生化学」(新井隆一編)、恒星社厚生閣、81-86(1999)
12. 木村 茂、魚類コラーゲンの分子種、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村

## 参考文献

1. Palmiter, R. D *et al.*, Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein - growth hormone fusion genes, *Nature*, **300**, 611-615 (1982)
2. Devlin, R. H *et al.*, Extraordinary salmon growth, *Nature*, **371**, 209-210 (1994)
3. 熊井英水、澤田好史、海産魚類養殖業の現状と課題、「最新海産魚の養殖」(熊井英水編)、湊文社、2-16 (2000)
4. 豊原治彦、志水寛、魚体の死後硬直と魚肉の物性の関係、*日本水産学会誌*, **54**, 1795-1798 (1988)
5. 豊原治彦、安藤正史、筋肉の物性変化, 水産学シリーズ 86「魚類の死後硬直」(山中英明編)、恒星社厚生閣、42-49 (1991)
6. 豊原治彦、魚介類のテクスチャー、シリーズ食品の科学「魚の科学」(鴻巣章二監修、阿部宏喜・福家真也編)、朝倉書店、79 - 86 (1994)
7. 豊原治彦、魚介類の組織、「水産食品の事典」(竹内昌昭、藤井建夫、山澤正勝編)、朝倉書店、98-104 (2000)
8. 豊原治彦、魚肉のテクスチャー「おいしさの事典」(山野善正編)、朝倉書店、268-273 (2003)
9. 安藤正史、魚肉の軟化機構、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村 茂編)、恒星社厚生閣、73-82 (1997)
10. 佐藤健司、魚肉の冷蔵とV型コラーゲン、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村 茂編)、恒星社厚生閣、83-90 (1997)
11. 木村 茂、魚類のコラーゲン、「水産動物筋肉タンパク質の比較生化学」(新井健一編)、恒星社厚生閣、81-90 (1989)
12. 木村 茂、魚類コラーゲンの分子種、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村

- 茂編)、恒星社厚生閣、9-17(1997) (野哲也編)、恒星社厚生閣、63-79
13. Massova, I *et al.*, Matrix metalloproteinases: Structure, evolution, and diversification. *FASEB J.*, **12**, 1075-1095 (1998)
  14. Nagase, H. and Woessner, J. F. Jr., Matrix metalloproteinase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21491-21494 (1999)
  15. Takeuchi, K. *et al.*, Cloning and characterization of cDNA for carp matrix metalloproteinase 9. *Fish. Sci.*, **68**, 610-617 (2002)
  16. Kinoshita, M. *et al.*, cDNA cloning and characterization of two gelatinases from Japanese flounder. *Fish. Sci.*, **68**, 618-626(2002).
  17. Kubota, M. *et al.*, Solubilization of Type I collagen from fish muscle connective tissue by matrixmetalloproteinase-9 at chilled temperature. *Fish. Sci.*, **69**, 1053-1059 (2003)
  18. Gomez, D.E. *et al.*, Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions, *Eur. J. Cell Biol.*, **74**, 111-122 (1997)
  19. Brew, K. *et al.*, Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1477**, 267-283, (2000)
  20. Kubota, S. *et al.*, Occurrence of two distinct types of tissue inhibitor of metalloproeinase-2 (TIMP-2) in teleost fish. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1629**, 102-108 (2003)
  21. 豊原治彦、有用発現ベクターの開発、「魚類の DNA」(青木 宙、隆島史夫、平野哲也編)、恒星社厚生閣、99-116 (1997)
  22. 吉崎悟朗、隆島史夫、遺伝子導入魚の作出と外来遺伝子の発現、「魚類の DNA」(青木 宙、隆島史夫、平野哲也編)、恒星社厚生閣、80-98 (1997)
  23. 尾里建二郎、若松佑子、トランスジェニックメダカと ES 細胞、「魚類の

DNA」(青木 宙、隆島史夫、平野哲也編)、恒星社厚生閣、63-79  
(1997)

24. Kinoshita, M. and Tanaka, M., Transgenic medaka as a model for fish biology and aquaculture, "Aquatic Genomics" (Eds. By Shimizu, N. *et al.*), 320-320 (2003)
25. 豊原治彦: 鮮魚の美味しさを決めるもの、アクアネット、3、 20-24 (2000)



## 図の説明

### 図1 魚類筋肉の構造

魚体を輪切りにすると等高線状の筋が見える。これが筋隔膜である。筋肉の一部を拡大すると、さまざまな太さの筋繊維が走っていることがわかる。これらの筋繊維は筋内膜によりたがいに結合されている。筋隔膜や筋内膜を結合組織とよぶ。このように魚の筋肉は大別して、筋繊維と結合組織から構成されている。<sup>25)</sup>

### 図2-A 魚肉の破断強度の測定法<sup>6)</sup>

魚の筋肉から厚さ10mmの刺身状の肉片を切り出し、直径8mmの円柱状のプラスチック製の棒を突き刺して、筋肉が破断されときの荷重を求める。

### 図2-B さまざまな魚の筋肉の冷蔵中の破断強度の変化<sup>6)</sup>

図1-A に示した方法で測定した結果。ただし、トラフグは肉質がきわめて硬いため、直径3mmの棒を使用している。0時間は即殺直後を示している。トラフグを除いて、24-48時間後にはかなり肉質が軟化していることが分かる。魚種によっては死後6-12時間後に一旦、肉質が硬くなっているのは、死後硬直による筋繊維の収縮に原因するものである。

### 図3 冷蔵中のマイワシ筋内膜の脆弱化

即殺直後と4℃で24時間冷蔵したマイワシの筋肉を10%の水酸化ナトリウム水溶液で処理することにより筋繊維を構成するタンパク質を溶かし出し、残った筋内膜構造を走査型電子顕微鏡により観察した。24時間後には、明らかに筋内膜構造が薄くなっている様子が分かる。筋内膜はそのほとんどがトリプルヘリックス構造をもつI型コラーゲンからなっている。

図4 ヒラメ TIMP-2b 遺伝子を導入したトランスジェニックメダカにおける肉質の改善を示す模式図

野生魚では生体内においてはコラーゲンの合成と分解のバランスが平衡関係にあるが、死後、TIMP-2b が MMP-9 から解離することによりコラーゲンの分解が亢進し、筋肉が軟化する。ヒラメ TIMP-2b 遺伝子を導入したトランスジェニックメダカにおいては、過剰に存在する TIMP-2b の働きで生体内においてもコラーゲンの分解が抑制されることから、肉質の向上が期待される。さらに、死後においても、MMP-9の活性が阻害され、冷蔵中の軟化が抑制されることが期待される。

図5 ヒラメ TIMP-2 遺伝子導入メダカの作出手順

受精卵にマイクロインジェクションによりヒラメ TIMP-2b 遺伝子を導入すると、その受精卵から生じた  $F_0$  世代においてはヒラメ TIMP-2b 遺伝子は体内ではモザイク状に存在する。しかし、 $F_0$  を野生魚と交配してできた  $F_1$  では全身の細胞にヒラメ TIMP-2b 遺伝子が分布している。この  $F_1$  をさらに野生魚と交配してできた  $F_2$  では理論上50%の個体にヒラメ TIMP-2b 遺伝子が存在することが期待される。PCR分析の結果、ここでは6尾中4尾に導入遺伝子が認められた。

图1

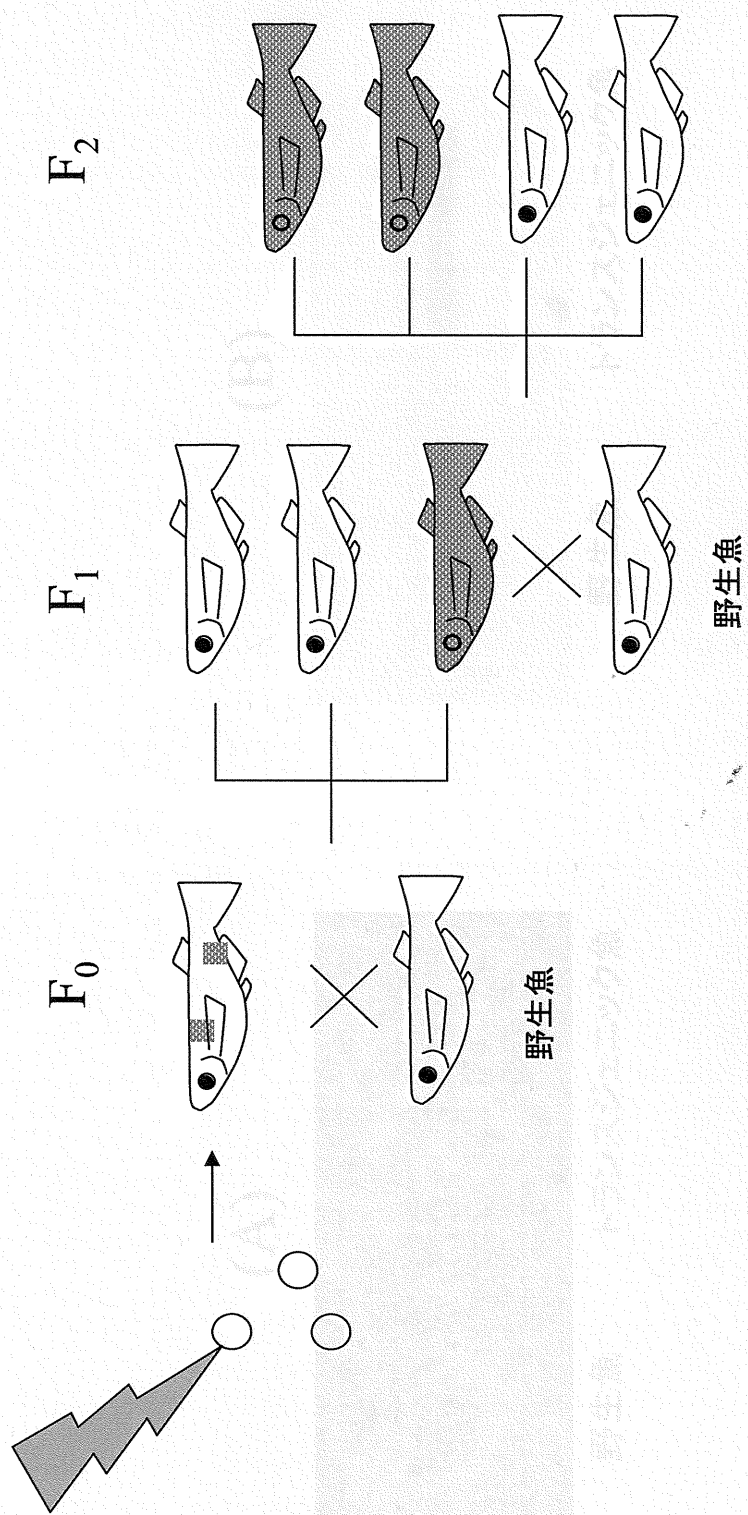
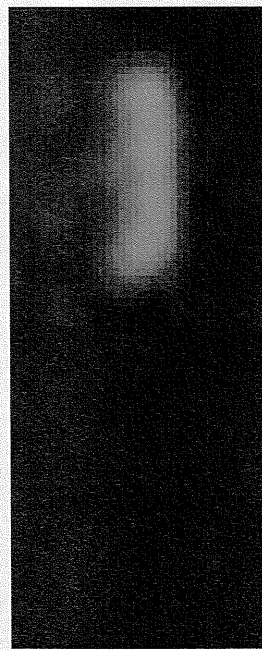


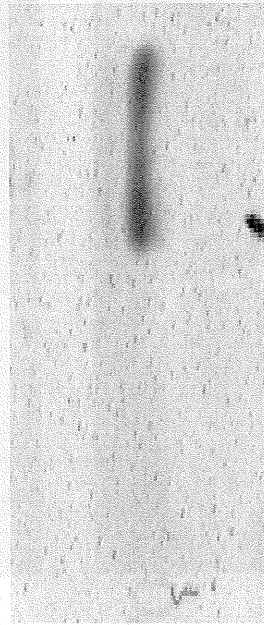
図2

(A)



野生魚      トランスジェニック魚

(B)



野生魚      トランスジェニック魚



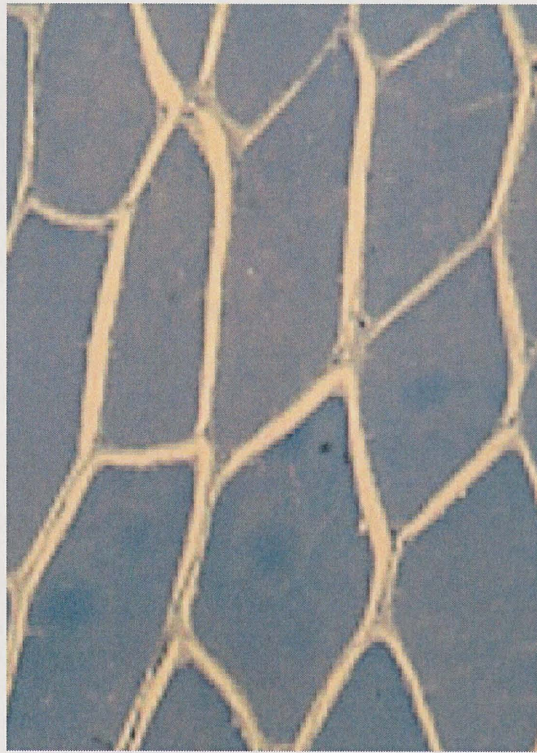
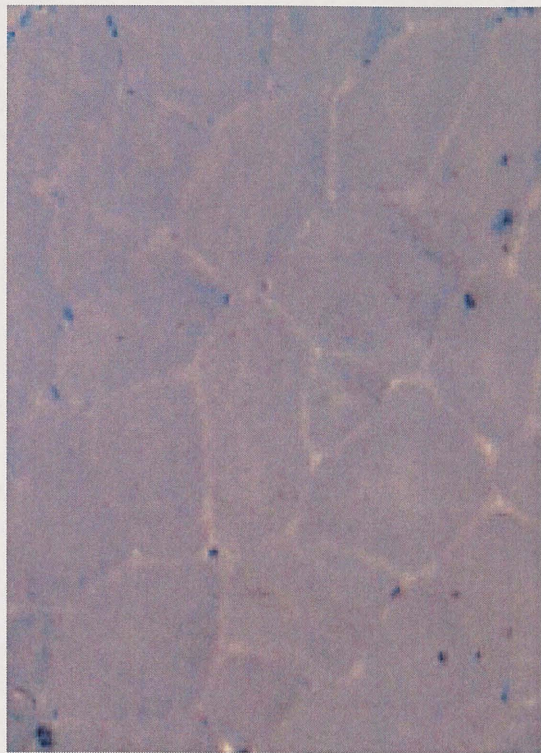


0 h

4 °C →



24 h



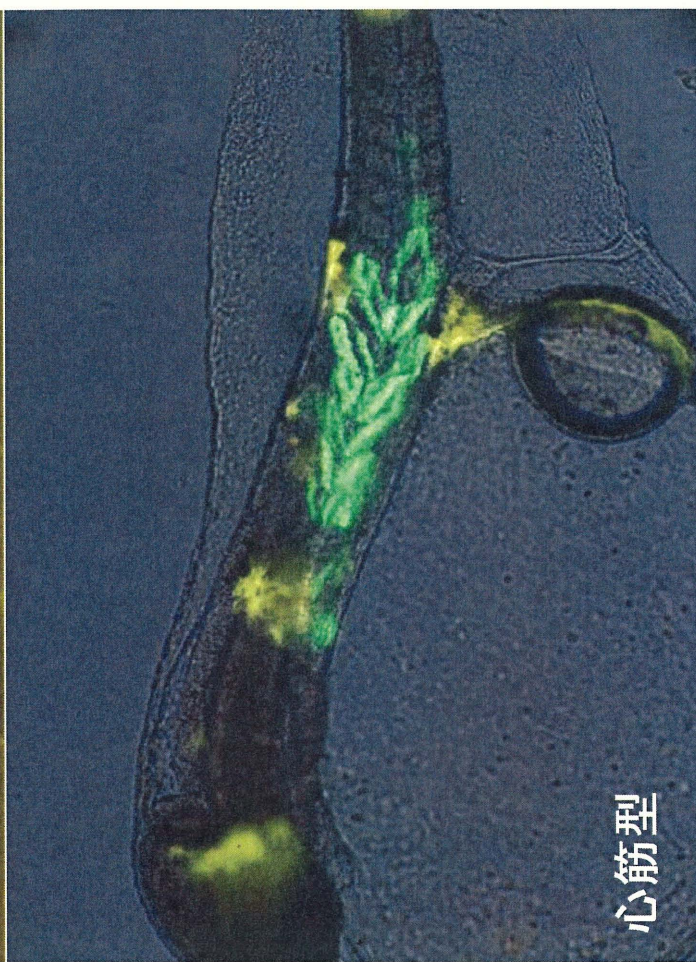
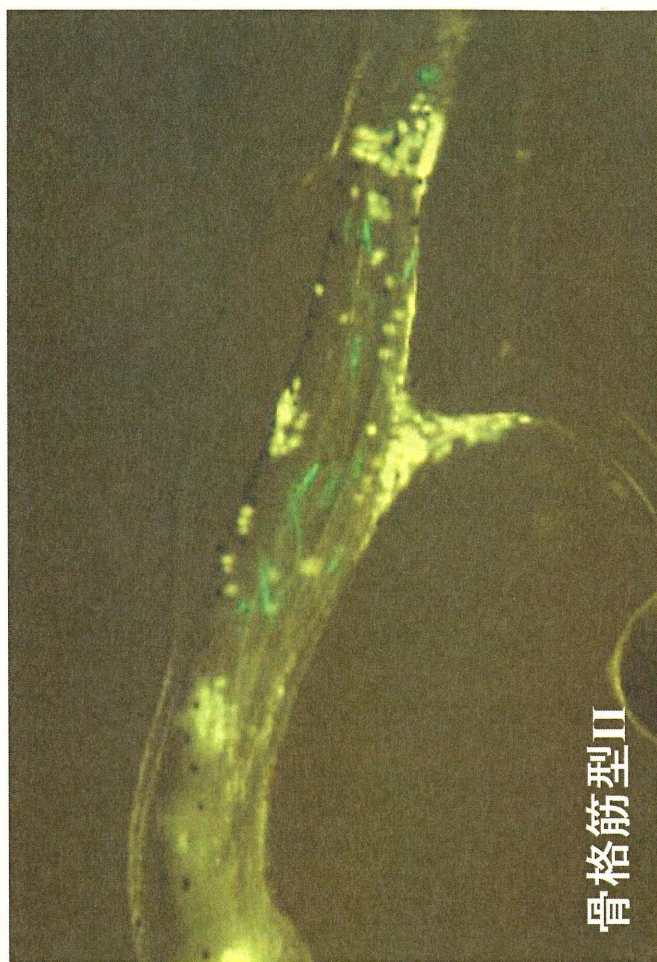
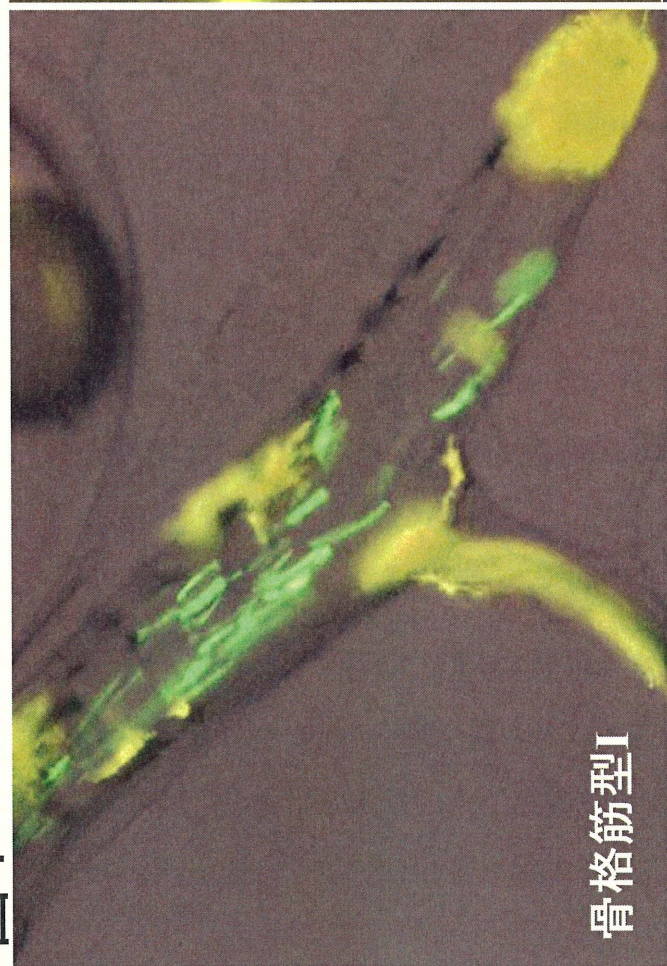
トランスジェニック魚

野生魚

心筋型



图4





## 養殖魚の肉質の遺伝子レベルでの制御

### Regulation of Fish Meat Quality by Transgenic Technology

豊原治彦\*

\*Haruhiko Toyohara 京都大学 農学研究科 応用生物科学専攻 助教授

養殖魚の大半は、刺身や寿司ネタとして生(なま)で食される。生食においては、肉の歯ごたえが品質を決定するもっとも重要な要素であるが、畜肉とくらべて魚の筋肉は死後の軟化が速やかであり、養殖魚では特にその傾向が著しい。筆者らは軟化抑制に重要な役割を果たす遺伝子として TIMP-2 を同定し、個体レベルの遺伝子組換えであるトランスジェニック技術を用いて、モデル実験としてメダカにこの遺伝子を過剰発現させることにより、魚類の肉質を遺伝子レベルで制御できることを見出した。

#### 1. はじめに

1982年に、マウスの卵にラットの成長ホルモン遺伝子をマイクロインジェクションすることにより、通常の約2倍の体重を持つジャイアントマウスが作り出された。<sup>1)</sup> この実験は、外来遺伝子を単に物理的に卵に注入することでトランスジェニック動物の作出が可能であることを示した画期的な研究であった。その後、この方法を用いて様々な動物で同様の実験が試みられ、1994年にはジャイアントサーモンが作出されるにいたった。<sup>2)</sup>

一方、1960年代にはじまった海産魚の養殖は、高速道路網の充実や活魚輸送技術の発達とあいまって、我が国の魚の消費形態に大きな変革をもたらした。現在では、マダイやブリでは生産量の大半が養殖魚で占められており、<sup>3)</sup> そのほとんどが刺身や寿司ネタとして生(なま)で食べられている。さらに最近では、刺身や寿司は、健康志

向ブームの影響から欧米でも受け入れられるようになり、海外で寿司屋を見かけることもそう珍しいことではなくなってきた。

魚の生食において、いわゆるコリコリとした歯ごたえはその品質を決定する最大の要素であるが、一般に魚の肉質は牛肉などの畜肉と比較して軟らかく、しかも死後その硬さは急激に低下する。<sup>4, 5, 6)</sup> このように魚肉はたとえ低温でも死後、筋肉の軟化が速やかに進行するために鮮度がきわめて重要であり、売り場においてのシェルフライフは他の食品にくらべてきわめて短い。本稿では、筆者らがこれまで行ってきた魚肉の軟化機構に関する研究結果と、トランスジェニック技術を用いた遺伝子レベルにおけるその抑制方法について概説する。

## 2. 魚の肉質を決める要素

私たち日本人は生の魚を食べるとき、「鮮度のよい魚ほど歯ごたえがよくておいしい」という食感を無意識のうちに重視している。これは、魚は鮮度がよいほど歯ごたえがしっかりしているため、歯ごたえのよさが高品質の象徴として、日本人の中に広く受け入れられているためである。余談ではあるが、刺身や寿司などの魚の生食は最近では欧米でもかなり普及しているが、彼らに歯ごたえの話をする、多くの欧米人から「刺身の歯ごたえは、硬いのと軟らかいのとではどちらがよいのか」といった質問を受ける。このことから判断して、彼らはコリコリとした生の魚肉の歯ごたえを、必ずしも品質を決定する重要な要素とは考えていないようである。このことは、「新鮮な魚＝コリコリした歯ごたえ＝おいしい」という感覚が、決して先天的な感覚ではなく、日本人が後天的に学習したものであることを裏付けている。

ところで、新鮮な魚肉が持つ歯切れのよさは、魚肉の持つどのような構造に由来するのだろうか。実は、コリコリとした歯ごたえを感じるためには軟らかすぎても硬すぎてもだめで、両者の構造が不連続に重なり合っていることが重要である。それでは魚肉において硬い構造体と軟らかい構造は、どのような構造体に相当するだろうか。図1に魚



の筋肉の構造を示した。焼き魚や煮魚を食べるとき、魚肉を箸でつまむと一定の幅のW字型にほぐれてくることがある。これは魚の筋肉がW字型の一定の厚さの構造が集まってできているからである。このW字の境界にあたる白い筋を筋隔膜とよぶ。筋隔膜と筋隔膜の間はたくさんの筋繊維(筋細胞)で連結されている。これらの筋繊維は収縮・弛緩することで泳ぐために重要な働きをしており、各筋繊維どうしは筋内膜という構造でしっかり接着されている。筋隔膜や筋内膜は結合組織とよばれ、コラーゲンを主成分とする体液に不溶な一群のタンパク質から構成されている。<sup>7)</sup>

このように魚肉は、大別して結合組織と筋繊維の2種類の構造からなるが、前述の硬い構造体と軟らかい構造体はそれぞれどちらに相当するのだろうか。この問題の解答を得るために、魚肉に人為的に荷重を加え、肉の中のどの部分が壊れているかを顕微鏡で詳しく調べた。その結果、荷重により最初に破壊されるのは結合組織であることがわかった。<sup>6)</sup> このことは、軟らかい構造体に相当するのは結合組織であり、硬い構造に相当するのが筋繊維であることを意味している。つまり歯で刺身を噛むと、歯に加えた力より結合組織の弾力が勝っている間は弾力が感じられ、歯に加えた力がついにその弾力を上回ると、歯が一気に肉に食い込んでいき、コリコリした歯切れのよい感触を感じることができるわけである。

図2に、冷蔵中におけるさまざまな魚類筋肉の破断強度の変化を示した。このようにたいていの魚の筋肉は、死後、速やかに軟化するが、その原因は、生きている時にはしっかりした物理的強度を保っていた結合組織が、死ぬとその強度を失うことに原因する。<sup>6-10)</sup> 実際、図3に示すように即殺直後と24時間冷蔵後のマイワシの筋内膜の構造を比較してみると、24時間後には明らかにその構造が薄く脆弱化していることがわかる。前述したように、結合組織の主成分はコラーゲンというタンパク質である。コラーゲンはきわめて多くの分子種からなることが知られているが、魚肉の結合組織は、I型、IV型、V型の各コラーゲンから構成されと考えられている。<sup>11, 12)</sup> 筋繊維は基底膜とよばれる膜状のIV型コラーゲンからなるシートでおおわれ、基底膜はV型コラーゲン

を介して繊維状の I 型コラーゲンにつなぎとめられているものと推測される。量的には圧倒的に I 型コラーゲンが多く、IV 型と V 型はごく微量にすぎないことから、図2で観察される結合組織のほとんどは、I 型コラーゲンからなると考えられる。したがって、冷蔵中に筋内膜の構造が目に見えて薄くなっていくのは、I 型コラーゲンが溶け出して失われていることを意味している。I 型コラーゲンの可溶化は低温度条件下でも時間依存的に進行することから、何らかの酵素学的反応に原因すると予想された。筆者らは I 型コラーゲンの可溶化は、I 型コラーゲンを基底膜の IV 型コラーゲンにつなぎとめている V 型コラーゲンの酵素的分解によるものと推測し、その原因酵素の特定を試みた。

コラーゲンなどの結合組織を構成するタンパク質を分解する酵素としては、マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix Metalloproteinase, 以下 MMP と略す) が知られている。<sup>13-14)</sup> MMP はもともとオタマジャクシがカエルへと変態するときに、尾のコラーゲンを分解する酵素として発見されたものであるが、その後、癌細胞の転移や生物の初期発生過程における形態形成において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。現在では基質特異性などの違いから、20種類以上の MMP 遺伝子がヒトからクローニングされている。これらの MMP のうち、筆者らは V 型コラーゲンに対して分解活性を示す MMP-9 に注目し、ヒラメからその cDNA をクローニングした。<sup>15-16)</sup> 昆虫細胞を用いてその組換え体を作製し、別に調製した粗結合組織画分に低温度条件下で作用させたところ、死後の筋肉でみられるのと同様、I 型コラーゲンの可溶化が認められた。<sup>17)</sup> この実験結果から、筆者らは MMP-9 が I 型コラーゲン可溶化の原因酵素であると判断し、その活性抑制が魚肉の品質向上を図る上で重要であると考えた。MMP-9 はシグナルペプチドを持つプレプロ型前駆体として合成され、シグナルペプチドが切断されプロ型酵素が細胞外へ分泌された後にもアミノ末端側に存在するシステインスイッチとよばれる領域が、活性を抑制していると考えられている。活性発現にはこのシステインスイッチの解除が必要で、解除にはシステインスイッチ領域の自己触媒的な切断が関わっていることが予想されている。このような自己活性化の調節には、内因性の

MMP 阻害タンパク質である Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (以下 TIMP と略) が関わっており、これまでヒトでは TIMP1-4 の4種類の TIMP 分子種の存在が知られている。<sup>18-19)</sup> 筆者らはヒラメからこれら TIMP 遺伝子のクローニングを試み、2種類の TIMP-2 (以下 TIMP-2a と TIMP-2b) の cDNA を得た。<sup>20)</sup> 両 TIMP-2 の組換え体を作製し、試験管内において MMP-9 活性の阻害能を調べたところ、両 TIMP-2 ともに阻害活性を示したが、TIMP-2b の方がより強い阻害活性を示した。そこで TIMP-2b を導入したトランスジェニック魚を作れば、肉質の優れた魚ができるのではないかという着想に至った。この実験結果について述べる前に、次項でまずトランスジェニック魚の作出方法について概説したい。

### 3. トランスジェニック魚の作出方法

トランスジェニック魚を作り出す手順は、1. 導入遺伝子の選択、2. 発現ベクターの作製、3. 発現ベクターの受精卵への導入、4. 交配などによる導入遺伝子の固定、の4ステップからなる。<sup>21)</sup> まず、導入すべき遺伝子が決まれば、それを発現ベクターに組み込む。発現ベクターには、大腸菌の中で増幅するプラスミドとしての機能に加え、トランスジェニック魚において導入遺伝子の発現調節に関わる機能が含まれている。発現を調節する機能は発現ベクター中のプロモーターにより支配されており、通常、導入遺伝子を構成的に常時発現させるのか、あるいは特定の組織で(場合によっては特定の刺激に応答して)発現させるのかという情報を規定している。構成的な発現誘導には哺乳類などでも用いられるウイルス由来のプロモーターに加え、 $\beta$ -アクチンやペプチド伸長因子など構成的な発現をするタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域が用いられる。一方、組織特異的な発現誘導には、特定の組織で発現しているタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域(例えば次項で述べるような筋肉特異的発現には $\alpha$ -アクチンのプロモーター)が利用される。理想的には、このようなプロモーターとしては導入対象魚から得られたものが望ましいが、魚種が異なっても

うまく機能することが多い。このようにして構築した発現ベクターを、次に通常は受精卵（場合によっては未受精卵や精子）に導入する。そのための方法としては、細いガラス管による注入（マイクロインジェクション）が一般的に用いられるが、電気処理により一時的に卵に小さな穴を開けて入れる方法（エレクトロポレーション）、金のきわめて小さな粒に発現ベクターをまぶして散弾銃のように打ち込む方法（ジーンガン）、ウイルスを使って感染させる方法（ウイルスベクター法）など種々の方法も開発されている。<sup>22)</sup>

いずれの方法を用いるにせよ、トランスジェニック魚を作り出すにあたってもっとも重要なことは、次世代に導入遺伝子を伝達させるために、遺伝子導入した卵から発生した個体が成熟したときに、その配偶子（メスなら卵、オスなら精子）の染色体遺伝子に導入遺伝子が組み込まれていることである。実際には、1細胞期の受精卵に発現ベクターを打ち込んでも、その遺伝子が染色体に組み込まれるのは細胞がかなり増殖してからになる。組み込みのメカニズムについてはよくわかっていないが、おそらく、染色体DNAの組換えの際に取り込まれたり、ある種の転移因子を介して組み込まれたりするものと予想される。発生の途中段階で、あるひとつ細胞の染色体に偶然に導入遺伝子が組み込まれれば、その細胞の増殖、分化によって生じるそれ以降の世代の細胞群にはすべて導入遺伝子が分布することになる。その結果、この魚の体内には、導入した遺伝子を持つ細胞がモザイク状に点在することになる。したがって、もし仮に遺伝子導入魚がメスだとすると、卵巣内にも導入遺伝子を持つ細胞がモザイク状に分布する可能性がある。その場合、すべての卵が導入遺伝子を持つわけではないので、そのメスから生まれてくる子供すべてには導入遺伝子が伝わらない。そのため、その卵から孵化した子供を成魚まで育て、導入遺伝子を持つ個体を選別し、さらに交配を繰り返すことにより導入遺伝子を遺伝的に固定する必要がある。

#### 4. 遺伝子組換えによる肉質の向上

すでに述べたように、魚肉の歯ごたえは結合組織の物理的強度に依存し、冷蔵中



の軟化はその強度の低下に原因すること、生化学的にはこの現象は MMP-9 による結合組織タンパク質の分解反応であることが明らかとなった。MMP-9 の活性は、生体内ではその内因性インヒビター TIMP-2 により制御されているが、死後、その抑制がはずれることで MMP-9 の活性が制御できなくなり、その結果、結合組織コラーゲンの可溶化が起こるものと予想される。筆者は、この現象は個体の死の結果おこる血流の停止がもたらす生理的応答現象の延長にあるものと考えている。局所的には、筋肉組織において血流の停止は、低酸素、低栄養、あるいはある種の成長因子の供給停止などをもたらす。これは、生理的には失血やそれに引き続いておこる傷の修復機構と同様の応答現象を誘起するものと推測される。TIMP-2 と MMP-9 が解離し、MMP-9 が結合組織タンパク質を分解する反応は、このような一連の現象に含まれるひとつの生化学的過程と理解できる。

MMP-9 と TIMP-2 の結合と解離がどのように制御されているのかはまったくわからないが、前述のように組換え体を用いた実験から TIMP-2b が効果的に MMP-9 活性を阻害することが確認されたことから、トランスジェニック技術を用いて TIMP-2b を過剰発現させることで MMP-9 の活性を抑制させることができるかもしれないとの仮説を立てた。図4に示すように、通常の野生種の筋肉組織においては生体内ではコラーゲンの合成と分解はバランスのとれた状態にあるが、死後、MMP-9 が活性化されることによりそのバランスは分解に傾いてしまう。しかし、TIMP-2b を過剰発現させたトランスジェニック魚の筋肉組織では、生体内においても MMP-9 の活性は抑制されているため、コラーゲン合成が分解を上回り、結果として肉質の向上につながることが期待される上に、死後においても、大過剰に存在する TIMP-2b が MMP-9 の活性を抑制することから、軟化が抑制されと考えられる。しかし、一方でこのように TIMP-2b を過剰発現させると、さまざまな弊害も生じることが予想されることから、筆者らは、その発現を筋肉だけに限定する工夫を行った。具体的には、小型実験魚として取り扱いやすいメダカを用いて、<sup>23, 24)</sup>  $\alpha$ -アクチンという筋肉だけに発現しているタンパク質をコードする遺伝子

のプロモーター領域(日下部岳広博士よりご供与)にヒラメ TIMP-2b 遺伝子を結合した発現ベクターを用いた。

図5にヒラメ TIMP-2b 遺伝子導入メダカの作出手順を示した。メダカ受精卵にマイクロインジェクションによりこの発現ベクターを注入し、孵化、成長させ  $F_0$  を得た。前項に述べたように、 $F_0$  では体内にヒラメ TIMP-2b 遺伝子を持つ細胞がモザイク状に分布しているため、もし、導入遺伝子が染色体 DNA にうまく組み込まれているとしても、生殖細胞においてすべての卵や精子がヒラメ TIMP-2b 遺伝子を持つわけではない。そこで、成熟した  $F_0$  を野生種と交配し、得られた受精卵について PCR 分析を行い、増幅が認められた受精卵を産んだ親を、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子が染色体 DNA に組み込まれた  $F_0$  として選別した。この  $F_0$  (雄) の精子には一部にはあるが、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子が染色体 DNA に組み込まれたものが存在するので、その精子で野生種の雌から採取した卵を受精させて生まれた  $F_1$  世代の子供には、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子が最初から組み込まれていることになる。ここで重要なことは、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子を持つ  $F_1$  世代は、1細胞の受精卵の段階ですでにヘテロではあるがヒラメ TIMP-2b 遺伝子を持っているということである。したがって、この受精卵から生じた  $F_1$  の成魚は、生殖細胞も含め全身すべての細胞にヒラメ TIMP-2b 遺伝子を持っていることになる。このように  $F_1$  の生殖細胞すべてにヘテロにヒラメ TIMP-2b 遺伝子が存在しているので、この  $F_1$  と野生種との交配で生まれた次世代  $F_2$  には、理論的には50%の個体にヒラメ TIMP-2b 遺伝子が存在していることになる。実際、 $F_2$  個体の尾ビレの一部を切り取り(尾ビレを用いるのは、その個体を殺さずに導入遺伝子の有無を調べるため)、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子の存在を PCR で調べたところ、およそ半分の個体にその存在が確認された。そこで、遺伝子導入が確認された  $F_2$  を用いて、これらの個体でヒラメ TIMP-2b 遺伝子が実際に転写、翻訳されているのかを検討した。

PCR 分析でヒラメ TIMP-2b 遺伝子の存在が確認された  $F_2$  個体から mRNA を調製し、それを逆転写して得た cDNA についてヒラメ TIMP-2b 遺伝子の転写産物の有無を

PCR 分析で調べたところ、トランスジェニック個体においてのみ、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子の転写産物が検出された。さらにその翻訳産物であるタンパク質についてウェスタンブロット分析を行ったところ、mRNAと同様、トランスジェニック個体においてのみその発現が確認された。これらの結果は、人為的に導入したヒラメ TIMP-2b 遺伝子が F<sub>2</sub> 世代の個体において、正常に転写、翻訳されていることを証明するものであった。さらに、ヒラメ TIMP-2b タンパク質の筋肉における発現について免疫組織学的に検討したところ、興味深いことに、すべての筋肉細胞について一様のレベルで発現しているのではなく、特に小型の筋肉細胞で高いレベルで発現していることが明らかとなった。この事実は、このような小型細胞は筋肉細胞として若い細胞であり、そのため  $\alpha$ -アクチンの発現も高いレベルにあることが予想され、その結果、そのプロモーターにより発現が誘導されるヒラメ TIMP-2b タンパク質についても高いレベルで発現していることを示唆している。

前述したように、魚の肉質を決定する鍵は結合組織の物理的強度にある。そこで、非導入魚とヒラメ TIMP-2b 遺伝子導入魚の筋肉組織についてそれぞれ切片を作製し、組織学的観察を行った。非導入魚の筋肉を冷蔵庫で24時間貯蔵後に作製した切片では、ほとんどの筋繊維が筋内膜部分で分離していたが、興味深いことに、ヒラメ TIMP-2b 遺伝子導入魚の筋肉では、24時間貯蔵後に作製した切片でも筋繊維の分離は認められなかった。この事実は、ヒラメ TIMP-2b タンパク質がメダカ MMP-9 の活性を阻害し、その結果、トランスジェニック魚で筋内膜の強度低下が軽減された可能性を示している。メダカで可能なことは、基本的にはすべての魚類に適応可能であることから、TIMP-2b 遺伝子を強制発現させることで、養殖魚の肉質を改善することが可能と考えられる。マダイなどの有用海産魚ではすでにクローン魚作製技術が確立していることから、一旦、遺伝子導入に成功すれば、この技術を用いて肉質の優れたクローン魚を作り出すことは難しいことではない。野生種との交雑を完全に防止できる隔離されたエリアで、このような遺伝子組換え魚を養殖することは、法的な基盤、社会的なコンセンサスが得られれば、すでに技術的には可能なレベルに達しているといえる。

ろう。

## 5. 今後の課題

TIMP-2 は MMP-9 活性の制御のほかに様々な生物機能を有していることが予想される。したがって、その過剰発現は、発生初期の形態形成など種々の生物現象に悪影響を及ぼすことが懸念される。実際、最初に遺伝子導入を行った  $F_0$  の孵化率や生残率は他の外来遺伝子を導入した場合にくらべて低く、正常に孵化しても遊泳能力に異常がみられる個体も多かった。そのためこの実験では、正常な生殖能力を持つ  $F_0$  を 1 尾しか得ることができなかった。これらの  $F_0$  では、おそらくヒラメ TIMP-2b 遺伝子の発現量が異常をもたらすレベル以下であったため、正常に発生・成熟のプログラムが進行したものと考えられる。このように、同じようにマイクロインジェクションによって外来遺伝子を導入しても、個体によってその発現レベルに違いが生じることが多い。これは、染色体 DNA における組み込まれた位置の違いによると推測されている。導入遺伝子の発現は、偶然に組み込まれた部位の近辺に存在する発現調節に関わる遺伝子配列に大きく影響されるからである。現時点では、外来遺伝子の導入部位について制御することは困難であるが、導入標的部位の近傍の塩基配列を利用した相同組換えにより、近い将来、ピンポイントでねらった部位に外来遺伝子を導入することが可能になると予想される。相同組換えはその組換え頻度がきわめて低いため、受精卵へのマイクロインジェクションなどによる導入では、ねらい通りに組換えが起こった卵を得ることは不可能である。そのためマウスでは分化全能性を持つ ES 細胞が用いられている。魚類においても ES 細胞株の樹立がこれまで試みられてきたが、もっとも肝心のポイントである生殖細胞への分化能を保持させた株の樹立に成功していない。その意味から、本特集にある吉崎らが開発しつつある始原生殖細胞の株化に大きな期待が寄せられている。

最後に、本稿を発表する機会を与えていただいた近畿大学の家戸敬太郎先生に



御礼申し上げますとともに、共同研究者である木下政人、高木雅也(京都大学)、廣野育夫、青木宙(東京水産大学)、日下部岳広(姫路工業大学)、久保田賢(高知大学)、安藤正史(近畿大学)、鈴木徹(独立行政法人水産研究センター)の各氏に感謝申し上げます。なお、本研究の一部は、文部科学省科学研究費「基盤研究(B)(2)」と農林水産庁委託事業費「形態・生理機構の改変による新農林水産生物の創出に関する総合研究」によっています。

3. 池井英水、澤田好史、海産魚類養殖業の現状と課題、「海産魚類の養殖」(新井英水編)、海文社、2-16(2000)。
4. 豊原治彦、志水寛、魚体の死後硬直と魚肉の物性の関係、「日本水産学会誌」54: 1795-1799(1998)。
5. 豊原治彦、安藤正史、筋肉の軟性変化、「水産学・シリーズ86「魚類の死後硬直」」(山中英純編)、恒星社厚生閣、42-49(1991)。
6. 豊原治彦、魚介類のテクスチャー、シリーズ食品の科学「魚の科学」(藤原章二監修、阿部宏喜・富家真也編)、朝倉書店、79-86(1994)。
7. 豊原治彦、魚介類の組織、「水産食品の事典」(竹内昌昭、藤井健夫、山澤正勝編)、朝倉書店、98-104(2000)。
8. 豊原治彦、魚肉のテクスチャー「おいしさの本源」(山崎善正編)、朝倉書店、268-273(2003)。
9. 安藤正史、魚肉の軟化機構、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村 茂編)、恒星社厚生閣、73-82(1997)。
10. 佐藤純司、魚肉の冷蔵とV型スケーゲン、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村 茂編)、恒星社厚生閣、83-90(1997)。
11. 木村 茂、魚類のコラーゲン、「水産動物筋肉タンパク質の比較生化学」(新井健一編)、恒星社厚生閣、81-90(1989)。
12. 木村 茂、魚類コラーゲン糖分子種、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村

## 参考文献

1. Palmiter, R. D *et al.*, Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein - growth hormone fusion genes, *Nature*, **300**, 611-615 (1982)
2. Devlin, R. H *et al.*, Extraordinary salmon growth, *Nature*, **371**, 209-210 (1994)
3. 熊井英水、澤田好史、海産魚類養殖業の現状と課題、「最新海産魚の養殖」(熊井英水編)、湊文社、2-16(2000)
4. 豊原治彦、志水寛、魚体の死後硬直と魚肉の物性の関係、*日本水産学会誌* **54**、1795-1798 (1988)
5. 豊原治彦、安藤正史、筋肉の物性変化、水産学シリーズ 86「魚類の死後硬直」(山中英明編)、恒星社厚生閣、42-49 (1991)
6. 豊原治彦、魚介類のテクスチャー、シリーズ食品の科学「魚の科学」(鴻巣章二監修、阿部宏喜・福家真也編)、朝倉書店、79 - 86 (1994)
7. 豊原治彦、魚介類の組織、「水産食品の事典」(竹内昌昭、藤井建夫、山澤正勝編)、朝倉書店、98-104(2000)
8. 豊原治彦、魚肉のテクスチャー「おいしさの事典」(山野善正編)、朝倉書店、268-273(2003)
9. 安藤正史、魚肉の軟化機構、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村 茂編)、恒星社厚生閣、73-82(1997)
10. 佐藤健司、魚肉の冷蔵とV型コラーゲン、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村 茂編)、恒星社厚生閣、83-90(1997)
11. 木村 茂、魚類のコラーゲン、「水産動物筋肉タンパク質の比較生化学」(新井健一編)、恒星社厚生閣、81-90(1989)
12. 木村 茂、魚類コラーゲンの分子種、「魚介類の細胞外マトリックス」(木村

- 茂編)、恒星社厚生閣、9-17(1997)
13. Massova, I *et al.*, Matrix metalloproteinases: Structure, evolution, and diversification. *FASEB J.*, **12**, 1075-1095 (1998)
  14. Nagase, H. and Woessner, J. F. Jr., Matrix metalloproteinase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21491-21494 (1999)
  15. Takeuchi, K. *et al.*, Cloning and characterization of cDNA for carp matrix metalloproteinase 9. *Fish. Sci.*, **68**, 610-617 (2002)
  16. Kinoshita, M. *et al.*, cDNA cloning and characterization of two gelatinases from Japanese flounder. *Fish. Sci.*, **68**, 618-626(2002).
  17. Kubota, M. *et al.*, Solubilization of Type I collagen from fish muscle connective tissue by matrixmetalloproteinase-9 at chilled temperature. *Fish. Sci.*, **69**, 1053-1059 (2003)
  18. Gomez, D.E. *et al.*, Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions, *Eur. J. Cell Biol.*, **74**, 111-122 (1997)
  19. Brew, K. *et al.*, Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1477**, 267-283, (2000)
  20. Kubota, S. *et al.*, Occurrence of two distinct types of tissue inhibitor of metalloproeinase-2 (TIMP-2) in teleost fish. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1629**, 102-108 (2003)
  21. 豊原治彦、有用発現ベクターの開発、「魚類の DNA」(青木 宙、隆島史夫、平野哲也編)、恒星社厚生閣、99-116 (1997)
  22. 吉崎悟朗、隆島史夫、遺伝子導入魚の作出と外来遺伝子の発現、「魚類の DNA」(青木 宙、隆島史夫、平野哲也編)、恒星社厚生閣、80-98 (1997)
  23. 尾里建二郎、若松佑子、トランスジェニックメダカと ES 細胞、「魚類の

DNA」(青木 宙、隆島史夫、平野哲也編)、恒星社厚生閣、63-79  
(1997)

図1-24. Kinoshita, M. and Tanaka, M., Transgenic medaka as a model for fish  
魚体を用い biology and aquaculture, “Aquatic Genomics” (Eds. By Shimizu, N. et al.),  
大すると、320-320 (2003)

図に 25. 豊原治彦: 鮮魚の美味しさを決めるもの、アクアネット、3、20-24 (2000)

筋肉に、肉質、筋繊維と結合組織から構成されている。

図1-25. 魚肉の硬さの測定方法。

図1-26. 魚肉の硬さの測定方法。

魚の筋肉から厚さ10mmの刺身状の肉片を切り出し、直径3mmの円柱状のプラスチック製の棒を突き刺して、筋肉が破断されるときの荷重を測る。

図1-27. 魚肉の硬さの測定方法。

図1-28. さまざまな魚の筋肉の冷蔵中の硬さの変化。

図1-29. A) に示した方法で測定した結果。ただし、グラフは肉質が柔らかいため、直径 3mm の棒を使用している。0 時間は即殺直後を示している。グラフを横いて、24-48 時間後にはかなり肉質が軟化していることが分かる。魚種によっては死後 6-12 時間後にも、肉質が硬くなっているのは、死後硬直による筋繊維の収縮に原因しているのかもしれない。

図1-30. 冷蔵中のアイジシ筋内蔵の軟化。

即殺直後と4℃で24時間冷蔵したアイジシの筋肉を10%の水酸化ナトリウム水溶液で処理することにより筋繊維を溶壊する処理を施し出し、壊れた筋内蔵構造を走査型電子顕微鏡により観察した。24時間後には、明らかに筋内蔵構造が薄くなっている様子が分かる。筋内蔵はそのほとんどが平行なフィラメント構造をもつI型コラーゲンからなっている。



## 図の説明

### 図1 魚類筋肉の構造

魚体を輪切りにすると等高線状の筋が見える。これが筋隔膜である。筋肉の一部を拡大すると、さまざまな太さの筋繊維が走っていることがわかる。これらの筋繊維は筋内膜によりたがいに結合されている。筋隔膜や筋内膜を結合組織とよぶ。このように魚の筋肉は大別して、筋繊維と結合組織から構成されている。<sup>25)</sup>

### 図2-A 魚肉の破断強度の測定法<sup>6)</sup>

魚の筋肉から厚さ10mmの刺身状の肉片を切り出し、直径8mmの円柱状のプラスチック製の棒を突き刺して、筋肉が破断されときの荷重を求める。

### 図2-B さまざまな魚の筋肉の冷蔵中の破断強度の変化<sup>6)</sup>

図1-A に示した方法で測定した結果。ただし、トラフグは肉質がきわめて硬いため、直径3mmの棒を使用している。0時間は即殺直後を示している。トラフグを除いて、24-48時間後にはかなり肉質が軟化していることが分かる。魚種によっては死後6-12時間後に一旦、肉質が硬くなっているのは、死後硬直による筋繊維の収縮に原因するものである。

### 図3 冷蔵中のマイワシ筋内膜の脆弱化

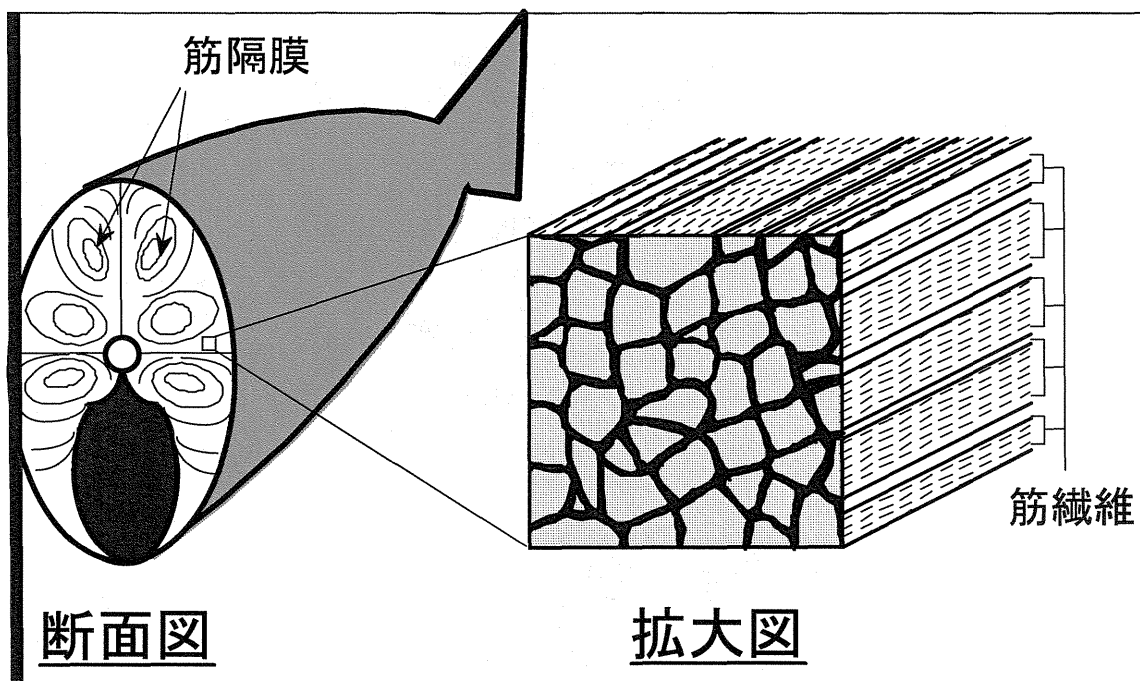
即殺直後と4℃で24時間冷蔵したマイワシの筋肉を10%の水酸化ナトリウム水溶液で処理することにより筋繊維を構成するタンパク質を溶かし出し、残った筋内膜構造を走査型電子顕微鏡により観察した。24時間後には、明らかに筋内膜構造が薄くなっている様子が分かる。筋内膜はそのほとんどがトリプリーヘリックス構造をもつI型コラーゲンからなっている。

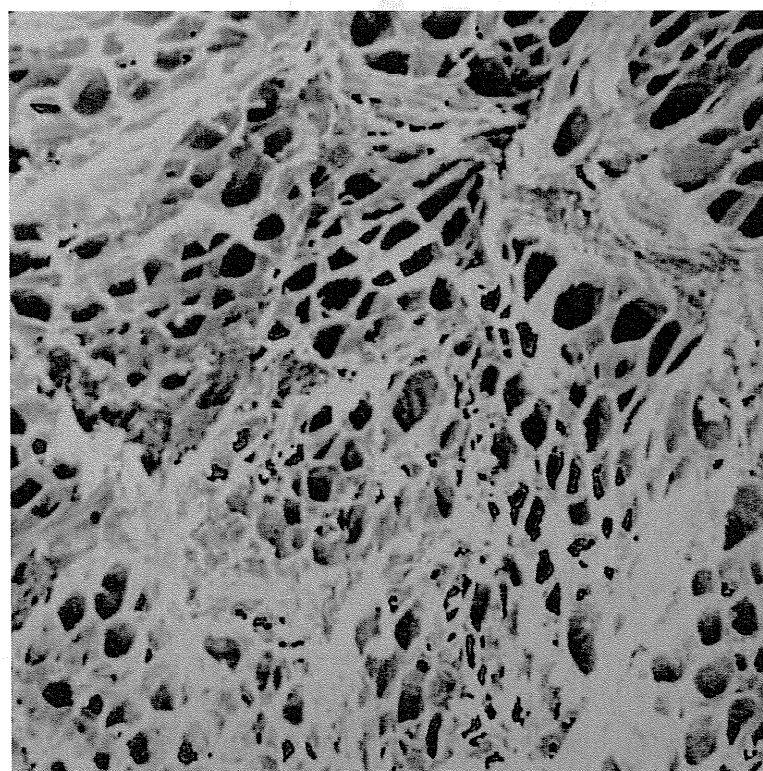
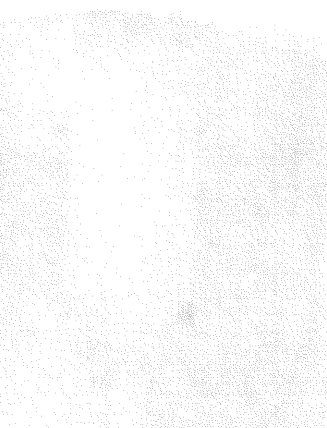
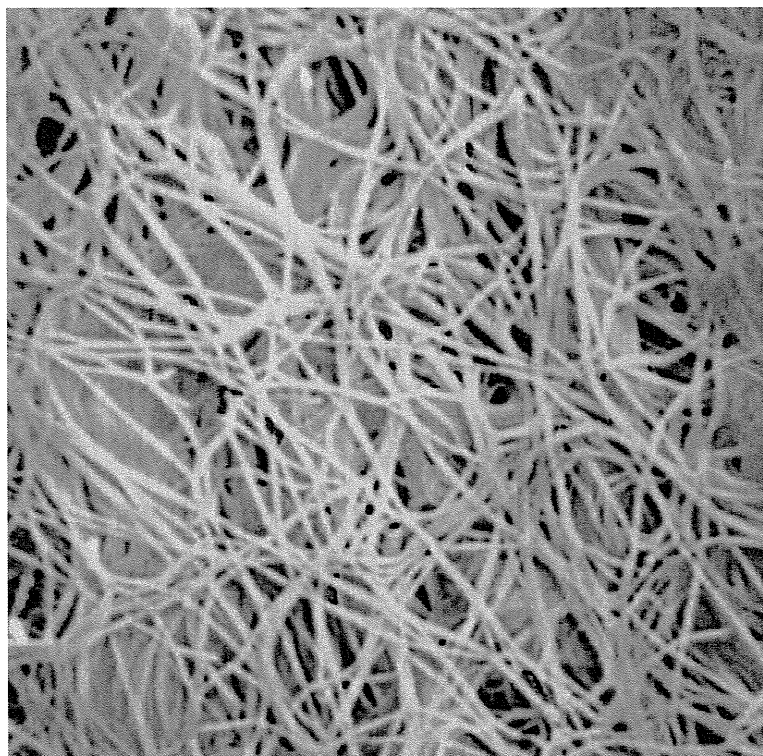
図4 ヒラメ TIMP-2b 遺伝子を導入したトランスジェニックメダカにおける肉質の改善を示す模式図

野生魚では生体内においてはコラーゲンの合成と分解のバランスが平衡関係にあるが、死後、TIMP-2b が MMP-9 から解離することによりコラーゲンの分解が亢進し、筋肉が軟化する。ヒラメ TIMP-2b 遺伝子を導入したトランスジェニックメダカにおいては、過剰に存在する TIMP-2b の働きで生体内においてもコラーゲンの分解が抑制されることから、肉質の向上が期待される。さらに、死後においても、MMP-9の活性が阻害され、冷蔵中の軟化が抑制されることが期待される。

図5 ヒラメ TIMP-2 遺伝子導入メダカの作出手順

受精卵にマイクロインジェクションによりヒラメ TIMP-2b 遺伝子を導入すると、その受精卵から生じた  $F_0$  世代においてはヒラメ TIMP-2b 遺伝子は体内ではモザイク状に存在する。しかし、 $F_0$  を野生魚と交配してできた  $F_1$  では全身の細胞にヒラメ TIMP-2b 遺伝子が分布している。この  $F_1$  をさらに野生魚と交配してできた  $F_2$  では理論上50%の個体にヒラメ TIMP-2b 遺伝子が存在することが期待される。PCR分析の結果、ここでは6尾中4尾に導入遺伝子が認められた。





② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮ ⑯ ⑰ ⑱ ⑲ ⑳ ㉑ ㉒ ㉓ ㉔ ㉕ ㉖ ㉗ ㉘ ㉙ ㉚ ㉛ ㉜ ㉝ ㉞ ㉟ ㊱ ㊲ ㊳ ㊴ ㊵ ㊶ ㊷ ㊸ ㊹ ㊺ ㊻ ㊼ ㊽ ㊾ ㊿



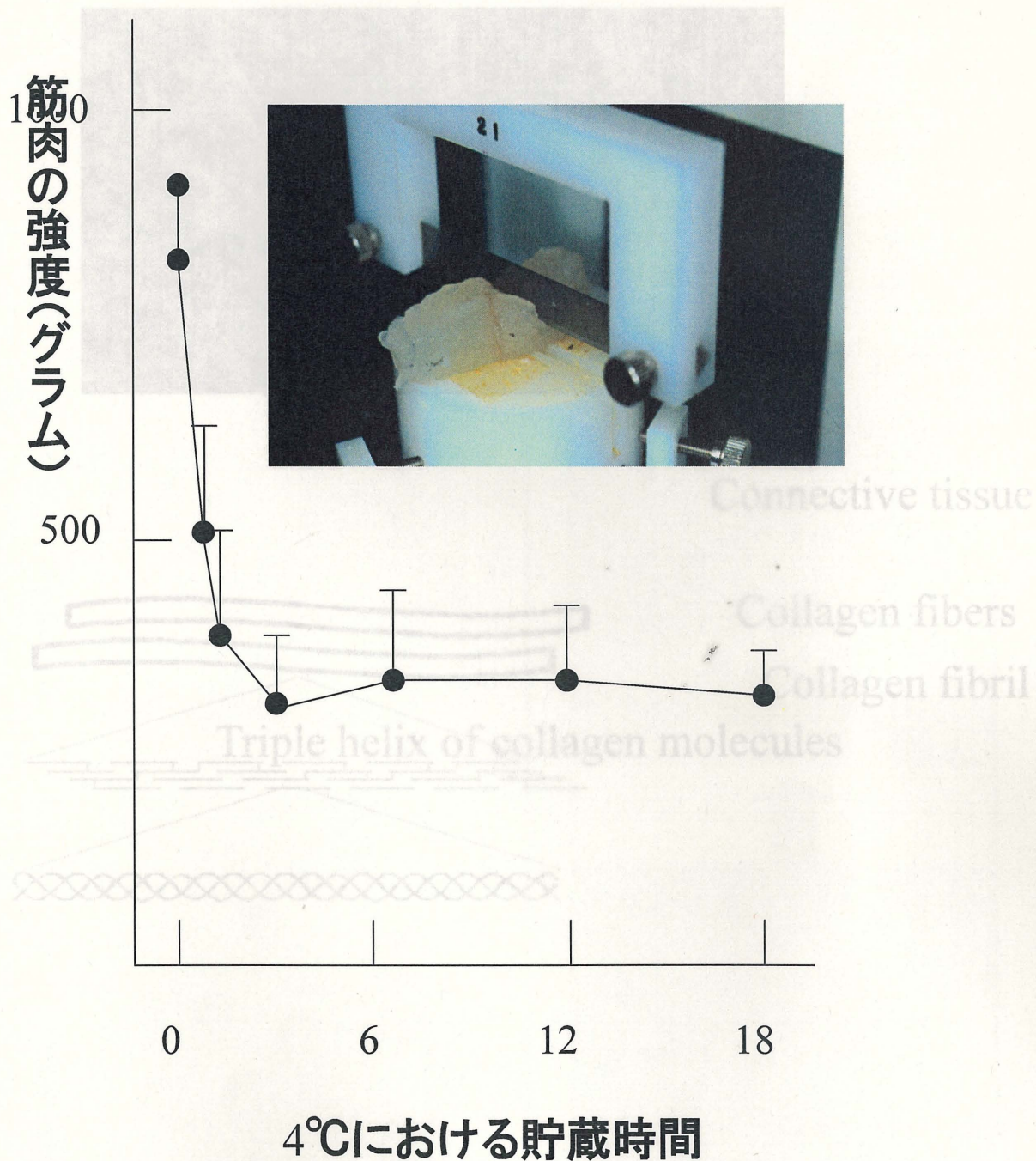
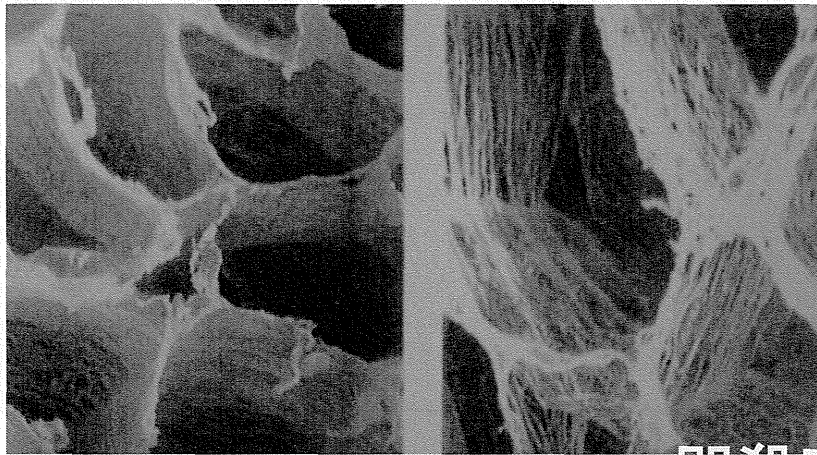


図 魚の筋肉の冷蔵中における物性変化。

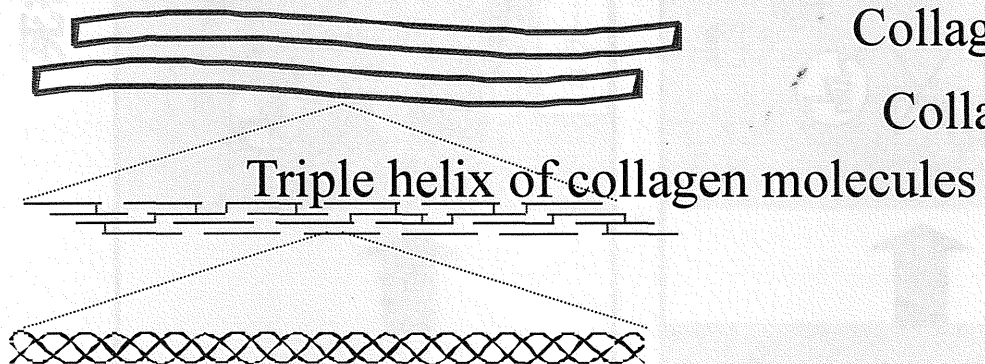
写真は、刺身状に魚肉を切り出し、その剪断力を測定している様子。即殺直後には高い値を示すが、死後数時間でその強度は著しく低下する。魚肉の歯ごたえが、冷蔵中に急速に失われていくことがよくわかる。



Connective tissue

Collagen fibers

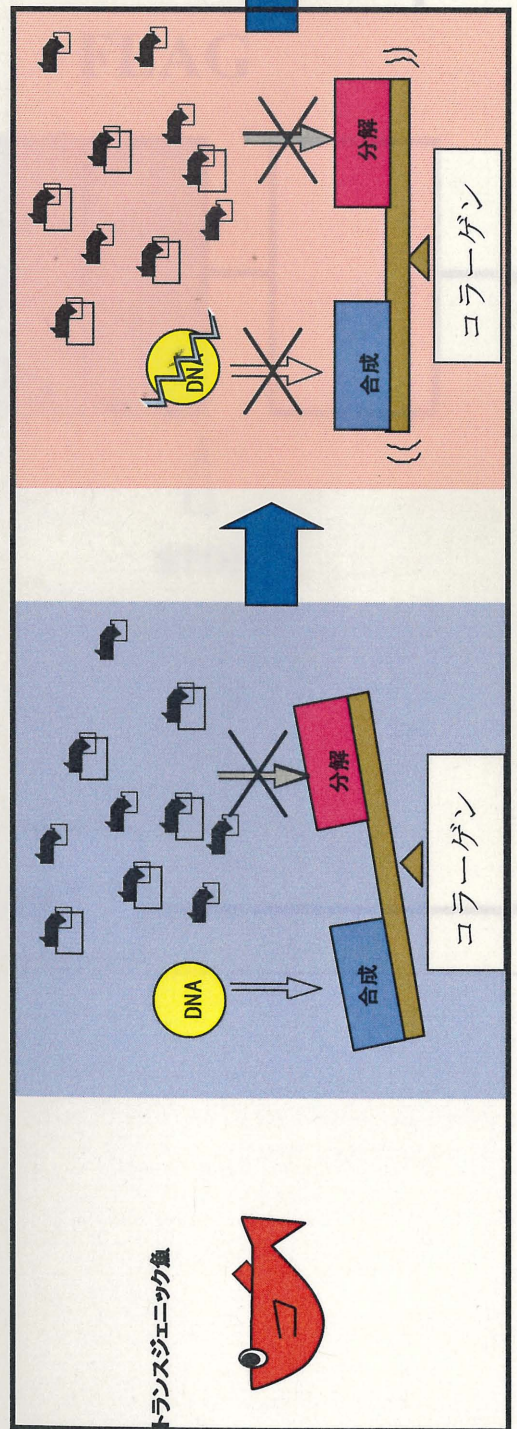
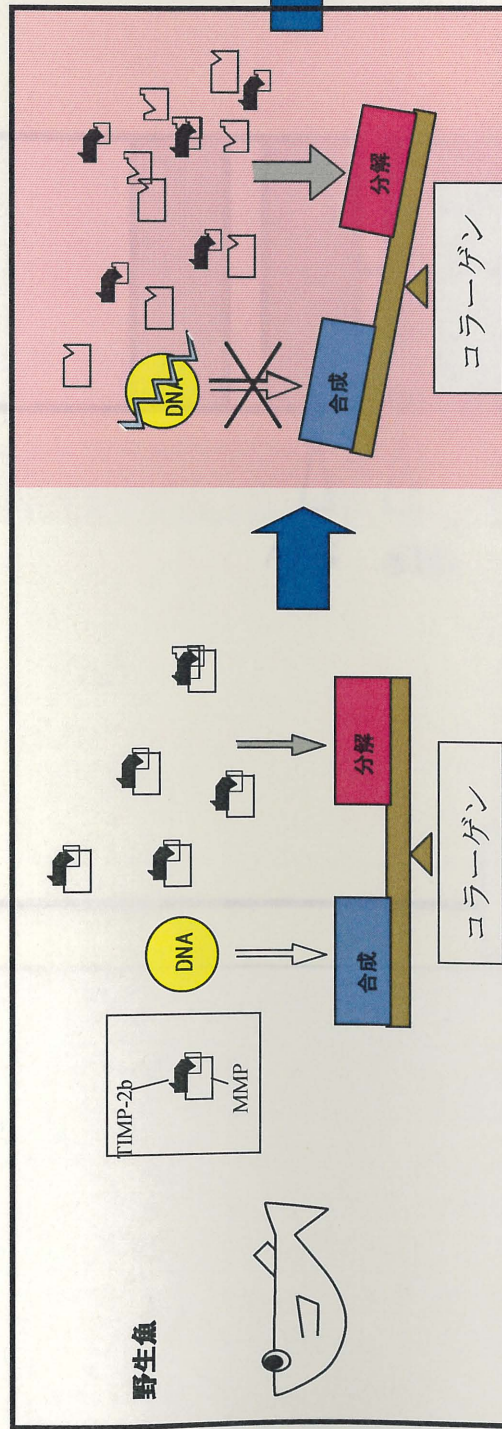
Collagen fibril





# 生体内

# 死後



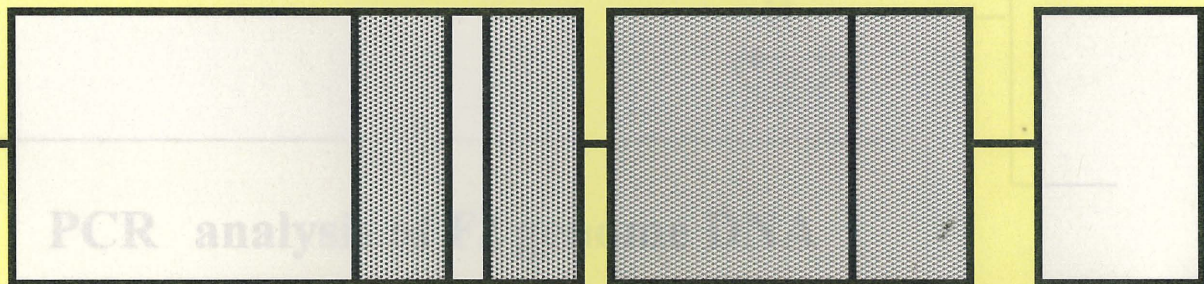


OIMA1

Jf-TIMP-2b

SV40pa

FLAG



ATG

ATG

STOP

Kan<sup>r</sup>



